

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 75 • № 2 • 2020 • АПРЕЛЬ — ИЮНЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### Обзоры

Борzych А.А., Виноградова О.Л., Тарасова О.С.  
Диафрагма: связь регуляции кровоснабжения  
с особенностями сократительной функции. . . . . 55

Граф А.В., Хиразова Е.Э., Маслова М.В., Соколова Н.А.  
Обестатин и его фрагменты: новый подход к регуляции массы тела  
в норме и при патологии. . . . . 65

### Оригинальные исследования

Романов Д.В., Ширнин С.Ю., Карлов Г.И., Дивашук М.Г.  
Цитогенетическое изучение *Aegopodium podagraria* (Umbelliferae)  
для ее использования в селекции. . . . . 81

Филиппова Г.В., Дарханова В.Г., Строева Н.С., Николаева О.А.,  
Андросова Д.Н. Размножение *in vitro*, рост и развитие *ex situ* редкого вида  
*Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. (Liliaceae). . . . . 87

Шевелева А.А., Митрофанова И.В., Горина В.М., Чирков С.Н.  
Молекулярный анализ новых крымских изолятов вируса оспы сливы. . . . . 93

Бондорина И.А., Кабанов А.В., Мамаева Н.А., Хохлачева Ю.А.  
Коллекционный фонд лаборатории декоративных растений ГБС РАН:  
исторический аспект и современное состояние. . . . . 100

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Половые особенности поведения  
крыс с фетальным вальпроатным синдромом. . . . . 107

## CONTENTS

### *Reviews*

- Borzykh A.A., Vinogradova O.L., Tarasova O.S. Diaphragm: relationship between the regulation of blood supply and the characteristics of the contractile function . . . . . 55
- Graf A.V., Khirazova E.E., Maslova M.V., Sokolova N.A. Obestatin and its fragments: a new approach to the regulation of body weight in normal and pathological conditions . . . . . 65

### *Research articles*

- Romanov D.V., Shirnin S.Y., Karlov G.I., Divashuk M.G. Cytogenetic study of *Aegopodium podagraria* (Umbelliferae) for its use in breeding . . . . . 81
- Filippova G.V., Darkhanova V.G., Stroeva N.S., Nikolaeva O.A., Androsova D.N. *In vitro* reproduction, *ex situ* growth and development of a rare species *Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. (Liliaceae). . . . . 87
- Sheveleva A.A., Mitrofanova I.V., Gorina V.M., Chirkov S.N. Molecular characterization of new Crimean *Plum pox virus* isolates . . . . . 93
- Bondorina I.A., Kabanov A.V., Mamaeva N.A., Khokhlacheva J.A. The collection of the laboratory of ornamental plants of MBG RAS: historical overview and current state. . . . . 100
- Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A. Sex-specific behavioral characteristics of rats with fetal valproate syndrome . . . . . 107

## ОБЗОР

УДК 611.73:612.133

## Диафрагма: связь регуляции кровоснабжения с особенностями сократительной функции

А.А. Борзых<sup>1,\*</sup>, О.Л. Виноградова<sup>1,2</sup>, О.С. Тарасова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Лаборатория физиологии мышечной деятельности, Институт медико-биологических проблем РАН, Россия, 123007, г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А;

<sup>2</sup>кафедра экстремальной и экологической медицины, факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119991, г. Москва, Ломоносовский пр-т., д. 27, корп. 1;

<sup>3</sup>кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

Диафрагма – уникальная скелетная мышца, она активна в течение всей жизни организма и поэтому отличается от локомоторных мышц по свойствам мышечных волокон и механизмам регуляции кровеносного русла. В данном обзоре мы ставили перед собой задачи рассмотреть особенности строения мышечной ткани диафрагмы, которые обеспечивают ее интегральные сократительные характеристики, сопоставить механизмы регуляции тонуса сосудов в диафрагме и локомоторных мышцах и показать взаимосвязь регуляторных механизмов сосудистого тонуса в диафрагме с особенностями ее сократительной функции. Диафрагма отличается от большинства других скелетных мышц высоким содержанием как медленных низкоутомляемых мышечных волокон типа I, так и быстрых волокон типа IIb, что обеспечивает выносливость и высокие скоростно-силовые характеристики диафрагмы. Мышечные волокна в диафрагме мельче, а плотность капиллярного русла намного выше, чем в локомоторных мышцах. Поступление крови в капиллярное русло диафрагмы регулируют артерии и артериолы, которые по регуляторным механизмам частично сходны с сосудами мышц, состоящих преимущественно из оксидативных мышечных волокон, а частично – с сосудами мышц, состоящих из преимущественно гликолитических мышечных волокон. Такое разнообразие регуляторных механизмов обеспечивает кровоснабжение диафрагмы, адекватное ее функциональной нагрузке при различных режимах активности. Активность некоторых механизмов регуляции тонуса сосудов сильно различается на проксимальном и дистальном участках сосудистого русла диафрагмы, при этом функциональные особенности проксимальных артерий частично объясняются их близостью к аорте и небольшой длиной. Особенности сократительной функции и кровоснабжения диафрагмы в различных условиях надо учитывать при проведении тренировок дыхательной мускулатуры в спортивной и восстановительной медицине.

**Ключевые слова:** *изоформы тяжелых цепей миозина, метаболические типы мышечных волокон, дыхательная мускулатура, резистивные артерии, рабочая гиперемия, симпатическая нервная система, оксид азота*

Клетки нашего организма нуждаются в постоянном поступлении кислорода, что обеспечивается работой дыхательных мышц, среди которых ключевая роль принадлежит диафрагме. Диафрагма представляет собой мышечно-сухожильную перегородку между грудной полостью и брюшной. В мышечной части диафрагмы выделяют три отдела: (1) позвоночный, который начинается от тел поясничных позвонков и межпозвоночных дисков; (2) реберный, который берет свое начало от внутренней поверхности 7–12 ребер и реберной дуги; (3) грудинный [1]. Мышечные пучки этих трех отделов сходятся к центральному сухожильному участку диафраг-

мы. Основную роль в обеспечении вдоха играет реберный отдел диафрагмы [1, 2].

Первая задача данного обзора – рассмотреть особенности строения мышечной ткани диафрагмы, которые обеспечивают ее интегральные сократительные характеристики. Во-первых, диафрагма – выносливая мышца: ее постоянная ритмическая активность в течение всей жизни организма не сопровождается утомлением. Во-вторых, она способна развивать быстрые сокращения, особенно при активации дыхания во время функциональной нагрузки. Например, при интенсивной физической нагрузке вентиляция легких повышается примерно в три раза у мелких млеко-

питающих, таких как крысы [3], и в 10–20 раз — у человека [4]. Следует отметить, что многократное повышение частоты дыхания и дыхательного объема у человека при максимальной нагрузке не сопровождается изменением относительной длительности фазы вдоха (как и при спокойном дыхании, фаза вдоха составляет примерно половину дыхательного цикла [5]), что предъявляет высокие требования к скорости сокращения и расслабления диафрагмы. Наконец, диафрагма может развивать сильные кратковременные сокращения, что особенно важно для реализации защитных реакций, таких как кашель и чихание [6].

Известно, что продолжительная сократительная активность скелетных мышц невозможна без их адекватного кровоснабжения. Поэтому наша вторая задача в данном обзоре — охарактеризовать особенности кровоснабжения диафрагмы при спокойном дыхании и его изменения при повышении вентиляции легких, а также сопоставить активность механизмов регуляции тонуса сосудов в диафрагме и локомоторных мышцах. Наконец, наша третья задача — показать, что особенности сократительной активности диафрагмы связаны с особенностями ее кровоснабжения. В этом наш обзор отличается от других публикаций о диафрагме, которые, как правило, затрагивают лишь один из аспектов проблемы.

#### Типы мышечных волокон в диафрагме и их рекрутирование при различных режимах сократительной активности

Скелетные мышцы млекопитающих состоят из разных типов мышечных волокон, которые различаются по экспрессируемым изоформам тяжелых цепей миозина (myosin heavy chain — МНС) и, соответственно, скорости развития сокращения, метаболическим характеристикам (оксидативный или гликолитический способ синтеза АТФ) и скорости развития утомления — см. соответствующие обзоры [7, 8]. В мышечных волокнах (muscle fibers — MF) взрослых млекопитающих могут экспрессироваться четыре изоформы МНС: одна медленная (МНС I — MF I) и три быстрые (МНС IIa — MF IIa, МНС IIx — MF IIx, МНС IIb — MF IIb). Для

MF I типа характерен синтез АТФ за счет окислительного фосфорилирования, тогда как MF II типа являются оксидативно-гликолитическими (MF IIa) или преимущественно гликолитическими (MF IIx и MF IIb). Склонность к развитию утомления растет в ряду MF I — MF IIa — MF IIx — MF IIb [7]. У разных млекопитающих характеристики MF могут различаться: например, в мышцах крупных млекопитающих и человека отсутствует изоформа МНС IIb, а в мышцах грызунов наиболее высоким окислительным потенциалом обладают не MF I, а MF IIa. Мышцы, участвующие в поддержании позы тела (позные мышцы), состоят преимущественно из MF I — например, в камбаловидной мышце крысы доля MF I достигает 85–90% [9], тогда как в быстрой подошвенной мышце крысы MF I всего 6–9% и преобладают MF IIx и MF IIb [9, 10].

В сравнительно крупных локомоторных мышцах грызунов гликолитические MF располагаются ближе к поверхности мышцы, а оксидативные — во внутренней её части. Так, поверхностная («белая») часть этих мышц состоит почти исключительно из MF IIb [9, 10]. Напротив, центральная («красная») часть латеральной и медиальной головок икроножной мышцы крысы содержит от 20 до 40% MF I [9–12] и до 40% MF IIa, тогда как доля MF IIb в ней ничтожно мала [9, 10]. Между «белой» и «красной» располагается т.н. «смешанная» часть, обладающая промежуточными характеристиками.

Диафрагма должна быть выносливой, но вместе с тем способной к развитию быстрых ритмических сокращений. В связи с этим мышечная ткань реберного отдела диафрагмы крысы содержит около 40% медленно утомляемых MF I [10–13], 30% быстрых MF IIa и около 30% быстрых MF IIb [10, 13]. Следует отметить, что высокое содержание одновременно MF I и MF IIb не характерно для большинства локомоторных мышц (рис. 1).

В связи с высоким содержанием MF I и MF IIa ткань диафрагмы имеет высокий окислительный потенциал: активность цитратсинтазы, ключевого фермента цикла Кребса, в диафрагме сопоставима с активностью этого фермента в позных локомо-

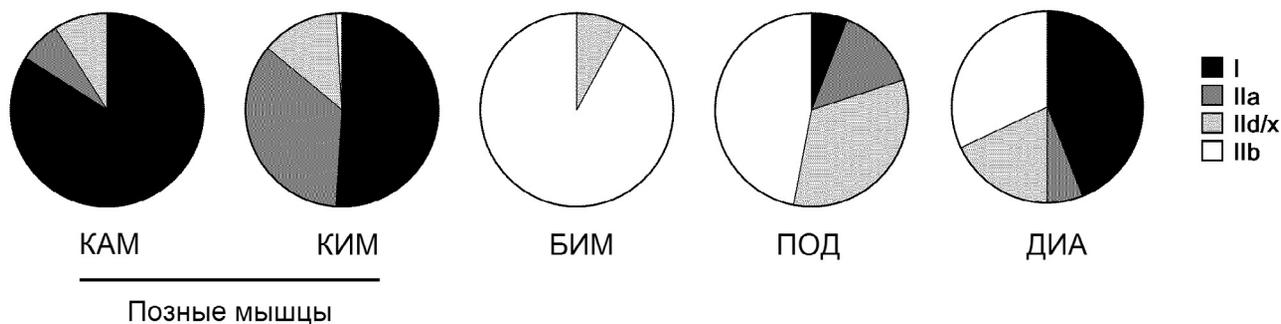


Рис. 1. Соотношение разных типов мышечных волокон в мышцах крысы: тип I — медленные, тип II (подтипы a, d/x и b) — быстрые. КАМ — камбаловидная мышца, КИМ и БИМ — красная и белая части икроножной мышцы, ПОД — подошвенная мышца, ДИА — реберный отдел диафрагмы. Схемы составлены по средним значениям, приведенным в работе Делпа и Дюана [10].

торных мышцах [14] или же превышает ее [10, 15, 16]. Уровень экспрессии PGC-1 $\alpha$ , ключевого регулятора митохондриального биогенеза [17], в диафрагме такой же высокий, как в камбаловидной мышце и красной части икроножной мышцы [14].

Оксидативные MF для синтеза АТФ нуждаются в поступлении кислорода. В связи с этим окислительный потенциал локомоторных мышц положительно коррелирует с плотностью их капиллярного русла [18, 19]. В диафрагме количество капилляров на одно мышечное волокно почти вдвое больше, чем в позных локомоторных мышцах [20, 21]. Различия между диафрагмой и локомоторными мышцами еще более очевидны при подсчете числа капилляров на единицу площади среза мышцы, потому что MF диафрагмы сравнительно мелкие. Во многих работах показано, что площадь поперечного сечения как медленных, так и быстрых MF в реберном отделе диафрагмы меньше, чем в локомоторных мышцах [10, 12, 22].

Таким образом, высокий окислительный потенциал и выносливость мышечной ткани диафрагмы определяются высоким содержанием MFII и MFIIa. Плотность капиллярного русла в диафрагме больше, а площадь поперечного сечения MF – меньше, чем в локомоторных мышцах, что благоприятно для доставки кислорода и его утилизации постоянно работающими MF. Вместе с тем способность диафрагмы к развитию быстрых сокращений определяется высоким содержанием быстрых MFIIb.

Сокращение диафрагмы происходит при активации мотонейронов, которые расположены в шейном отделе спинного мозга (у человека и крыс – в сегментах C<sub>3</sub>–C<sub>5</sub>), аксоны этих мотонейронов идут к диафрагме в составе правого и левого диафрагмальных нервов [1]. Вовлечение MF в сократительный ответ происходит в составе двигательных единиц (мотонейрон и группа иннервируемых им MF), например, в диафрагме крысы – около 500 двигательных единиц [1]. В скелетных мышцах двигательные единицы состоят из однотипных MF и в соответствии с этим делятся на медленные устойчивые к утомлению (состоят из MFI), быстрые устойчивые к утомлению (состоят из MFIIa), быстрые с промежуточной устойчивостью к утомлению (состоят из MFIIId/x) и быстрые легко утомляемые (состоят из MFIIb) [6, 7]. Рекрутирование двигательных единиц диафрагмы происходит в соответствии с уровнем ее механической активности [1, 6]. Дыхательная функция диафрагмы, как при спокойном дыхании, так и при его активации во время физической нагрузки или гипоксии/гиперкапнии, связана с рекрутированием двигательных единиц, состоящих из MFI и MFIIa. В условиях затрудненного дыхания, например, при нарушении проводимости дыхательных путей, в работу включаются

двигательные единицы, состоящие из MFIIId/x, тогда как рекрутирование MFIIb происходит только при кратковременных сильных сокращениях диафрагмы, не имеющих отношения к нормальной вентиляции легких.

#### **Влияние физической нагрузки на кровоснабжение локомоторных и дыхательных мышц**

Распределение кровотока между скелетными мышцами в покое и во время физической нагрузки зависит от состава MF и функциональной активности мышц [23–25]. В отсутствие локомоции поддержание позы тела обеспечивается за счет активности мышц с высоким содержанием окислительных MF и именно такие мышцы в основном снабжаются кровью. Например, у крыс в покое кровоток в камбаловидной мышце и красной части икроножной мышцы в 5 и более раз выше, чем в белой части икроножной мышцы. При ритмической физической нагрузке невысокой интенсивности (например, умеренно быстрый бег) скорость кровотока растет преимущественно в мышцах с высоким окислительным потенциалом, а мышцы с высоким содержанием гликолитических волокон рекрутируются и снабжаются кровью при высокоинтенсивной нагрузке [26, 27].

Ключевой причиной расширения сосудов скелетных мышц при работе является повышение секреции из мышечных клеток продуктов метаболизма (метаболитов), большинство которых обладает сосудорасширяющим действием [28]. Вместе с тем показано, что мелкие артерии, приносящие кровь к мышечной ткани, также принимают участие в повышении мышечного кровотока при работе, хотя и не являются мишенью метаболической регуляции. Во время мышечной работы происходят координированные изменения сопротивления разных участков сосудистого русла скелетных мышц [25, 29, 30]. При развитии рабочей гиперемии сначала расширяются мелкие артериолы (по метаболическому механизму), это приводит к увеличению скорости кровотока и напряжения сдвига на эндотелии в проксимальных артериях и вызывает их расширение [30]. Расширение проксимальных артерий по механизму поток-вызванной дилатации является необходимым условием многократного повышения мышечного кровотока при физической нагрузке [30].

В дыхательных мышцах при спокойном дыхании уровень кровотока примерно такой же, как в мышцах, поддерживающих позу тела [26, 27, 31]. При физической нагрузке кровоснабжение дыхательных мышц быстро растет, причем в диафрагме – более выражено, чем в межреберных мышцах и мышцах брюшного пресса [31, 32]. Повышение кровотока при нагрузке в реберном отделе диафрагмы больше, чем в поясничном [2, 26], что говорит о ведущей роли реберного отдела в обеспечении интенсивной вентиляции легких. У крупных

млекопитающих (пони и собаки) кровотока в диафрагме растет пропорционально интенсивности нагрузки [31, 32]. У крыс уровень кровотока в диафрагме максимален в начале интенсивной работы, а затем постепенно снижается [27].

Следует отметить, что при интенсивной физической нагрузке диафрагма находится в условиях привилегированного кровоснабжения по сравнению с локомоторными мышцами. Во время мышечной работы увеличивается активность симпатической нервной системы, что необходимо для перераспределения кровотока в пользу работающей мускулатуры за счет сужения сосудов внутренних органов (кишечника, почек и др.) [33]. Вместе с тем показано, что даже при максимальной физической нагрузке (на уровне максимального потребления кислорода организмом) введение симпатолитиков сопровождается повышением кровотока в локомоторных мышцах [34]. Ограничение мышечного кровотока симпатическими влияниями предотвращает чрезмерное снижение периферического сопротивления сосудов и, следовательно, артериального давления при интенсивной работе большого количества мышц. Важно, что введение вазодилаторов во время интенсивной мышечной работы не сопровождается дополнительным повышением скорости кровотока в диафрагме [35]. Это означает, что в таких условиях сосуды диафрагмы не подвергаются симпатическим влияниям и находятся в максимально расширенном состоянии, в отличие от сосудов локомоторных мышц.

Существует экспериментально подкрепленная точка зрения, что при интенсивной мышечной работе может происходить перераспределение кровотока между локомоторными и дыхательными мышцами в пользу последних [36, 37]. Поддержание высокой активности симпатической системы при физической нагрузке обеспечивают рефлексы от механо- и хеморецепторов работающих мышц, причем хеморецепторные нервные волокна активируются продуктами метаболизма мышечных клеток [33]. Если при интенсивной вентиляции кровоснабжение диафрагмы становится ниже ее метаболических потребностей, рецепторы диафрагмы активируются и вызывают рефлекторное сужение сосудов: в большей степени в локомоторных мышцах и в меньшей степени – в дыхательных [36, 37]. Механизм доминирования рефлексов от рецепторов диафрагмы над рефлексами от рецепторов локомоторных мышц пока не ясен, но его функциональная роль очевидна, поскольку выполнение мышечной работы невозможно без активации внешнего дыхания. У крыс сужение артерий диафрагмы при интенсивной физической нагрузке может быть более выраженным, чем у крупных млекопитающих, и приводить к снижению диафрагмального кровотока при длительной нагрузке [27].

### **Различия регуляции тонуса сосудов в локомоторных мышцах с разными метаболическими характеристиками мышечных волокон**

Артерии и артериолы мышц, состоящих преимущественно из оксидативных или гликолитических MF, различаются по реакциям на констрикторные и дилаторные стимулы (для простоты изложения далее мы будем называть такие мышцы «оксидативными» и «гликолитическими»). Это видно из приведенных ниже данных о регуляции тонуса артерий и артериол таких мышц.

Интенсивность нейрогенного сужения сосудов мышц зависит от формируемой в ЦНС симпатической команды и характеристик симпатической нейротрансмиссии в сосудах: плотности иннервации и чувствительности гладкомышечных клеток к нейромедиатору норадреналину. Показано, что блокада  $\alpha$ -адренорецепторов у крыс увеличивает кровоток в мышцах, состоящих из гликолитических MF, но не влияет на кровоток в мышцах, включающих 20% и более медленных MF [38]. Устранение симпатических влияний путем травмирующего пережатия постганглионарных симпатических волокон у крыс также вызывает более выраженный прирост кровотока в белой части икроножной мышцы, чем в красной части этой мышцы и в камбаловидной мышце [39]. В исследовании на кошках показано, что реакции на раздражение симпатических нервов сосудов в мышцах с большой долей гликолитических MF (длинный разгибатель пальцев и икроножная мышца) более выражены, чем в мышцах с высокой оксидативной способностью (камбаловидная мышца) [40]. Таким образом, выраженность нейрогенного тонуса сосудов и вазоконстрикторных реакций на повышение симпатической активности в «гликолитических» мышцах выше, чем в «оксидативных».

Выраженное влияние симпатической нервной системы на кровоснабжение «гликолитических» мышц может быть связано с высокой адренореактивностью их артериальных сосудов – по крайней мере, на проксимальном участке сосудистого русла. Реакции изолированных артериол 1-го порядка на активацию  $\alpha_1$ -адренорецепторов (основная мишень норадреналина, секретлируемого нервными волокнами) в белой части икроножной мышцы крысы более выражены, чем в красной части [39]. Это может служить одной из причин менее выраженного повышения кровотока в «гликолитических» мышцах по сравнению с «оксидативными» во время аэробных физических упражнений, когда активность симпатической нервной системы значительно растет [33]. Для более мелких артериол этих мышц таких различий не было выявлено [41, 42]. Отметим, что симпатическое сужение сосудов в работающих мышцах реализуется на проксимальном участке сосудистого русла, где сосуды в меньшей степени подвергаются дилаторному действию тканевых метаболитов и поэтому сохра-

няют способность реагировать на медиаторы симпатических волокон [43]. В связи с этим для перераспределения кровотока в пользу «оксидативных» мышц при аэробной нагрузке важна высокая адренореактивность именно проксимальных сосудов «гликолитических» мышц. К сожалению, данные по сравнению плотности симпатической иннервации артериальных сосудов в различных типах мышц в литературе отсутствуют.

Интересно, что выраженность дилататорных реакций на изопротеренол (агонист  $\beta$ -адренорецепторов) в белой части икроножной мышцы крысы также больше, чем в красной, на уровне артериол 1-го порядка [44], но не изменена в более дистальных артериолах [41].

Повышение кровотока в работающих скелетных мышцах обусловлено влиянием многочисленных вазодилататорных факторов, которые выделяются из клеток как окружающей ткани, так и сосудистой стенки [28]. Одним из тканевых факторов является аденозин, который образуется путем дефосфорилирования АТФ, секретируемого МФ при сокращениях [28]. Снижение содержания аденозина в мышечном интерстиции вызывает более выраженное уменьшение кровотока в «оксидативных» мышцах по сравнению с «гликолитическими» [45], несмотря на то, что артериолы «оксидативных» мышц обладают меньшей чувствительностью к аденозину, чем артериолы «гликолитических» мышц [44, 46, 47]. По-видимому, концентрация аденозина в «оксидативных» мышцах во время сокращений так высока, что он может вызывать расширение даже мало чувствительных к нему сосудов.

Еще одним важным регулятором мышечного кровотока во время работы является NO [28], основным источником которого является эндотелий сосудов [48]. Показано, что ацетилхолин, мощный стимулятор продукции NO эндотелием, вызывает более выраженные реакции расслабления в сосудистом русле [49] или изолированных артериолах [42, 47] «оксидативных» мышц по сравнению с «гликолитическими», что коррелирует с более высоким содержанием эндотелиальной NO-синтазы в артериолах «оксидативных» мышц [42].

При интенсивной работе скелетных мышц источником NO также является нейрональная NO-синтаза, которая локализуется в МФ [50]. В этих условиях рекрутируются мышцы, состоящие из быстрых гликолитических МФ, именно в таких мышцах выражено вазодилататорное влияние «мышечного» NO [50]. Следует отметить, что в «гликолитических» мышцах чувствительность артериол к NO выше, чем в «оксидативных» [44, 46], что способствует повышению скорости кровотока в «гликолитических» мышцах при интенсивной работе.

Как показано в предыдущем разделе, важным механизмом рабочей гиперемии является поток-

вызванная вазодилатация [30]. Казалось бы, эта эндотелий-зависимая реакция должна быть более выраженной в сосудах «оксидативных» мышц по причине высокого содержания эндотелиальной NO-синтазы [42]. Однако реакция расширения в ответ на повышение напряжения сдвига на эндотелии развивается быстрее и более выражена в изолированных артериолах белой, а не красной части икроножной мышцы [46, 51]. Авторы показали, что начальная фаза реакции на поток, более выраженная в артериолах белой части, обусловлена действием эндотелиального гиперполяризующего фактора, т.е. не имеет отношения к влиянию NO [51]. Вместе с тем вторая, поддерживающаяся во времени, фаза реакции, которая также была больше по величине в артериолах белой части по сравнению с красной, при ингибировании синтеза NO выражено уменьшалась [51]. Известно, что продукция NO эндотелием в ответ на напряжение сдвига определяется регуляцией активности эндотелиальной NO-синтазы путем сайт-специфического фосфорилирования [48]. Возможно, уровень активирующего фосфорилирования NO-синтазы в эндотелии артериол «гликолитических» мышц выше, чем в эндотелии «оксидативных» мышц.

Таким образом, характер влияния многих регуляторных механизмов различен в артериальных сосудах «оксидативных» и «гликолитических» мышц. Выраженность симпатических констрикторных реакций в «гликолитических» мышцах больше, чем в «оксидативных». Чувствительность гладкой мышцы к таким дилататорным факторам, как агонисты  $\beta$ -адренорецепторов, аденозин и NO, а также выраженность поток-вызванной вазодилатации, обусловленной чувствительностью эндотелия сосудов к напряжению сдвига, выше в артериях «гликолитических» мышц. Напротив, реакции расслабления при активации эндотелия агонистами более выражены в сосудах «оксидативных» мышц, содержание NO-синтазы в эндотелии сосудов «оксидативных» мышц также выше, чем сосудов «гликолитических» мышц.

#### **Сравнение особенностей регуляции тонуса сосудов диафрагмы и локомоторных мышц**

Поскольку мышечная ткань диафрагмы сочетает характеристики как медленных «оксидативных», так и быстрых «гликолитических» мышц, артериальные сосуды диафрагмы демонстрируют мозаичное сочетание признаков сосудов мышц различного типа (таблица). Проксимальный и дистальный участки сосудистого русла диафрагмы также весьма различны по регуляторным характеристикам. Все рассмотренные в этом разделе данные литературы относятся к сосудам диафрагмы крысы: насколько нам известно, для других млекопитающих сравнение реакций сосудов дыхательных и локомоторных мышц напрямую не проводилось.

Таблица

Различия в регуляторных механизмах между артериальными сосудами мышц, состоящих преимущественно из гликолитических и оксидативных мышечных волокон, а также между сосудами диафрагмы и локомоторных мышц

Показатели	Различия между артериями / артериолами «оксидативных» и «гликолитических» мышц	Различия между сосудами диафрагмы и икроножной мышцы	
		Артериолы	Приносящие артерии
Симпатическая регуляция / плотность иннервации	O < Г [38–40]	–	ДИА > ИМ [11]
Реакции на стимуляцию $\alpha_1$ -адренорецепторов	O < Г [39]	ДИА < (ОИМ=ГИМ) [41]	ДИА > ИМ [11, 12]
Реакции на стимуляцию $\beta$ -адренорецепторов	O < Г [44]	ДИА < (ОИМ=ГИМ) [41]	–
Реакции на аденозин	O < Г [44, 46, 47]	ОИМ < (ДИА=ГИМ) [47]	–
Чувствительность гладкой мышцы к NO	O < Г [44, 46]	–	ДИА > ИМ [11]
Реакции эндотелий-зависимого расслабления	O > Г [42, 47, 49]	ОИМ > (ДИА=ГИМ) [47]	ДИА > ИМ [11]

*Примечания.* O – оксидативные; Г – гликолитические; ДИА – диафрагма; ИМ – икроножная мышца, ОИМ – оксидативная («красная») часть икроножной мышцы; ГИМ – гликолитическая («белая») часть икроножной мышцы.

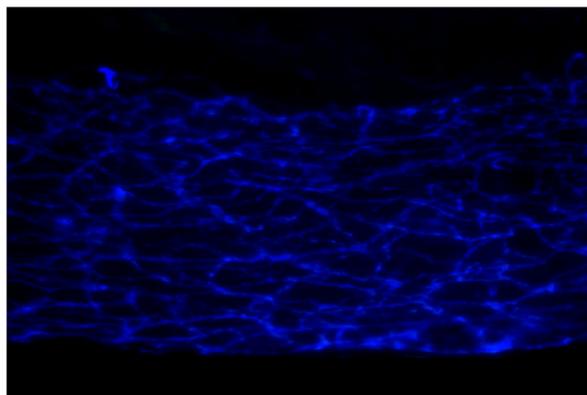
Сначала рассмотрим регуляторные особенности артериол диафрагмы. Во-первых, для них характерны сниженные сократительные ответы на вещества, способные активировать  $\alpha_1$ -адренорецепторы (норадреналин и фенилэфрин), по сравнению с ответами артериол как красного, так и белого отделов икроножной мышцы [41]. Реакции расслабления артериол диафрагмы на агонист  $\beta$ -адренорецепторов изопроterenол также меньше, чем в икроножной мышце [41]. Таким образом, различия по адренореактивности между артериолами диафрагмы и локомоторной мышцы, такие же, как между артериолами «оксидативных» и «гликолитических» мышц [39, 44]. Такие регуляторные особенности сосудов диафрагмы согласуются с данными о высоком окислительном потенциале ее мышечной ткани [10, 15, 16]. Напомним, что дыхательная функция диафрагмы связана с рекрутированием двигательных единиц, состоящих из MFI и MFIIa, для энергообеспечения сократительной активности которых необходим приносимый кровью кислород [1, 6]. По мнению ряда авторов, слабая выраженность сокращения в ответ на норадреналин препятствует снижению

кровотока в диафрагме при активации симпатической нервной системы [36, 37].

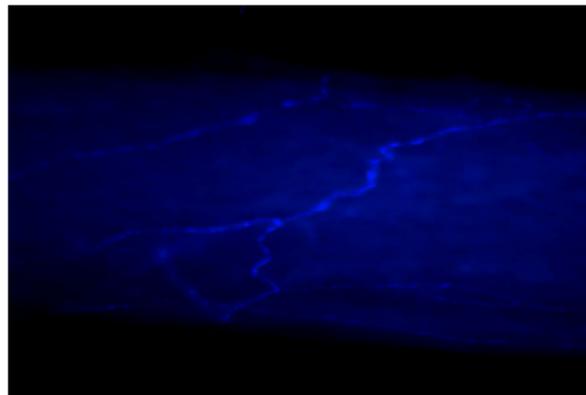
Вместе с тем дилататорные реакции артериол диафрагмы на активацию эндотелия с помощью ацетилхолина или на аденозин по величине не отличаются от реакций артериол белой части икроножной мышцы [47], то есть при таких воздействиях артериолы диафрагмы демонстрируют «гликолитический регуляторный фенотип» [42, 44, 46, 47, 49]. Эти наблюдения согласуются с высоким содержанием в диафрагме гликолитических MFIIb [10, 13], но их связь с регуляцией диафрагмального кровотока пока остается неясной.

На проксимальном участке сосудистого русла диафрагмы описаны иные особенности вазомоторных реакций, чем на дистальном участке. Во-первых, плотность сплетения адренергических нервных волокон в стенке артерий, приносящих кровь к диафрагме, намного выше, чем в стенке артерий икроножной мышцы [11] (рис. 2). Во-вторых, выраженность реакций гладкой мышцы на норадреналин и фенилэфрин в проксимальных артериях диафрагмы больше, чем в артериях, питающих икроножную мышцу, а не меньше, как на дис-

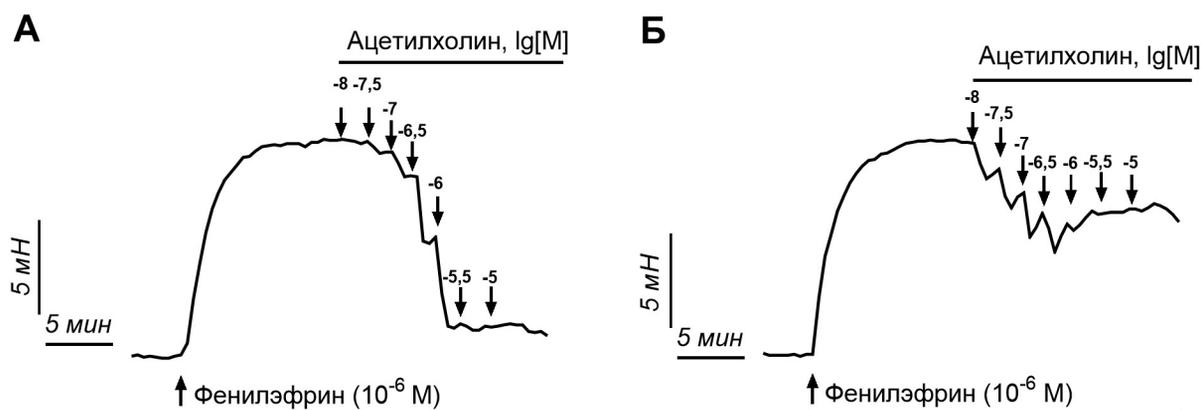
А



Б



**Рис. 2.** Плотность симпатической иннервации мелких артерий в диафрагме (А) намного выше, чем в икроножной мышце (Б). Тотальные препараты артерий обработаны глиоксиловой кислотой, которая образует флуоресцентный комплекс с катехоламинами [11]. В итоге адренергические нервные волокна имеют на препарате светлую окраску. Увеличение 20, размер кадра 400×300 мкм.



**Рис. 3.** Реакции эндотелий-зависимого расслабления на ацетилхолин более выражены в артерии диафрагмы (А) по сравнению с этими реакциями в артерии икроножной мышцы (Б). Регистрация вазомоторных реакций проводится в изометрическом режиме, перед аппликацией ацетилхолина препараты сокращены до 70–80% от максимального уровня с использованием агониста  $\alpha_1$ -адренорецепторов фенилэфрина.

тальном участке [11, 12]. В целом, по плотности симпатический иннервации и адренореактивности, артерии диафрагмы отличаются от артерий других «оксидативных» мышц [39, 40, 44, 46]. По нашему мнению, такие функциональные особенности артерий диафрагмы обусловлены их расположением в сосудистом русле: они ответвляются непосредственно от грудной аорты и вскоре входят в мышечную ткань, т.е. сравнительно короткие. Благодаря густой симпатической иннервации и высокой чувствительности к норадреналину артерии, приносящие кровь к диафрагме, должны обладать высоким уровнем нейрогенного тонуса, что защищает мышечную ткань от избыточной перфузии. Вместе с тем тоническое сужение артерий создает резерв их расширения, необходимый для значительного повышения кровотока в диафрагме при функциональной нагрузке. В локомоторных мышцах такой резерв обеспечивается нейрогенным сужением дистальных артериол [28], а в постоянно активной диафрагме эту функцию берут на себя проксимально расположенные мелкие артерии.

Расширение проксимальных артерий диафрагмы, необходимое для повышения кровотока при активации дыхания, может происходить за счет высокой активности эндотелий-зависимых механизмов регуляции тонуса. По нашим данным, при активации эндотелия ацетилхолином артерии, приносящие кровь к диафрагме, развивают более выраженные реакции расслабления по сравнению с реакциями артерий икроножной мышцы [11, 12] (рис. 3), что является характерной особенностью артерий мышц с высоким содержанием оксидативных MF [42, 47]. Вместе с тем гладкая мышца артерий диафрагмы обладает высокой чувствительностью к NO [11], как это свойственно артериям «гликолитических» мышц [44, 46]. Такое сочетание регуляторных особенностей на уровне продуцента NO (эндотелия) и его мишени (гладкой мышцы) может обеспечивать обильное кровоснабжение диафрагмы при функциональной нагрузке.

Таким образом, на проксимальном участке сосудистого русла диафрагмы проявляется действие двух регуляторных механизмов, обладающих противоположным влиянием: симпатическая система вызывает сужение, а эндотелий-зависимые механизмы – расширение артерий диафрагмы. Влияние первого из этих механизмов преобладает при спокойном дыхании и «сдерживает» кровоток в диафрагме, а второй механизм «включается» при повышении функциональной нагрузки, когда кровоток должен расти. Отметим, что в проблеме регуляции тонуса сосудов диафрагмы пока есть много нерешенных вопросов. Например, выраженные реакции эндотелий-зависимого расслабления в артериях диафрагмы показаны нами в экспериментах *in vitro* с использованием ацетилхолина, который не относится к ключевым регуляторам сосудистого тонуса *in vivo* [48]. Механизмы, которые могут активировать эндотелий мелких артерий диафрагмы в естественных условиях, пока не ясны и требуют дальнейших исследований.

Многие заболевания (хроническая обструктивная болезнь легких, миопатии, эндокринные и метаболические нарушения и др.), а также пребывание в условиях невесомости часто сопровождаются утомлением и снижением сократимости дыхательной мускулатуры [52]. Для коррекции этих нежелательных явлений используются методики тренировки дыхательных мышц с целью повышения их выносливости и скоростно-силовых качеств [53]. Различные методики тренировки мышц вдоха или выдоха также широко применяются в спортивной медицине [54]. При проведении таких тренировок нужно учитывать особенности строения мышечной ткани диафрагмы и ее кровоснабжения в различных условиях.

Обзор написан при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-75-00060). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fogarty M.J., Sieck G.C.* Evolution and functional differentiation of the diaphragm muscle of mammals // *Compr. Physiol.* 2019. Vol. 9. N 2. P. 715–766.
2. *Manohar M.* Costal vs. crural diaphragmatic blood flow during submaximal and near-maximal exercise in ponies // *J. Appl. Physiol.* 1988. Vol. 65. N 4. P. 1514–1519.
3. *Kirkton S.D., Howlett R.A., Gonzalez N.C., Giuliano P.G., Britton S.L., Koch L.G., Wagner H.E., Wagner P.D.* Continued artificial selection for running endurance in rats is associated with improved lung function // *J. Appl. Physiol.* 2009. Vol. 106. N 6. P. 1810–1818.
4. *Rosser-Stanford B., Backx K., Lord R., Williams E.M.* Static and dynamic lung volumes in swimmers and their ventilatory response to maximal exercise // *Lung.* 2019. Vol. 197. N 1. P. 15–19.
5. *Neder J.A., Dal Corso S., Malaguti C., Reis S., De Fuccio M.B., Schmidt H., Fuld J.P., Nery L.E.* The pattern and timing of breathing during incremental exercise: A normative study // *Eur. Respir. J.* 2003. Vol. 21. N 3. P. 530–538.
6. *Fogarty M.J., Mantilla C.B., Sieck G.C.* Breathing: Motor control of diaphragm muscle // *Physiology* (Bethesda). 2018. Vol. 33. N 2. P. 113–126.
7. *Schiaffino S., Reggiani C.* Fiber types in mammalian skeletal muscles // *Physiol. Rev.* 2011. Vol. 91. N 4. P. 1447–1531.
8. *Schiaffino S., Sandri M., Murgia M.* Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity // *Physiology* (Bethesda). 2007. Vol. 22. N 4. P. 269–278.
9. *Bloemberg D., Quadriatero J.* Rapid determination of myosin heavy chain expression in rat, mouse, and human skeletal muscle using multicolor immunofluorescence analysis // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 4: e35273.
10. *Delp M.D., Duan C.* Composition and size of type I, IIА, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle // *J. Appl. Physiol.* 1996. Vol. 80. N 1. P. 261–270.
11. *Тарасова О.С., Каленчук В.У., Борзых А.А., Андреев-Андреевский А.А., Буравков С.В., Шарова А.П., Виноградова О.Л.* Сравнение вазомоторных реакций и иннервации мелких артерий локомоторной и дыхательной мускулатуры у крыс // *Биофизика.* 2008. Т. 53. №. 6. С. 1095–1102.
12. *Borzykh A.A., Andreev-Andrievskiy A.A., Kalenchuk V.U., Mochalov S.V., Buravkov S.V., Kuzmin I.V., Borovik A.S., Vinogradova O.L., Tarasova O.S.* Strategies of adaptation of small arteries in diaphragm and gastrocnemius muscle to aerobic exercise training // *Hum. Physiol.* 2017. Vol. 43. N 4. P. 437–445.
13. *Metzger J.M., Scheidt K.B., Fitts R.H.* Histochemical and physiological characteristics of the rat diaphragm // *J. Appl. Physiol.* 1985. Vol. 58. N 4. P. 1085–1091.
14. *Борзых А.А., Гайнуллина Д.К., Кузьмин И.В., Шарова А.П., Тарасова О.С., Виноградова О.Л.* Сравнительный анализ экспрессии генов в локомоторных мышцах и диафрагме крысы // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2012. Т. 98. № 12. С. 1587–1594.
15. *Uribe J.M., Stump C.S., Tipton C.M., Fregosi R.F.* Influence of exercise training on the oxidative capacity of rat abdominal muscles // *Respir. Physiol.* 1992. Vol. 88. N 1–2. P. 171–180.
16. *Metzger J.M., Fitts R.H.* Contractile and biochemical properties of diaphragm: effects of exercise training and fatigue // *J. Appl. Physiol.* 1986. Vol. 60. N 5. P. 1752–1758.
17. *Popov D.V.* Adaptation of skeletal muscles to contractile activity of varying duration and intensity: the role of PGC-1 $\alpha$  // *Biochemistry* (Moscow). 2018. Vol. 83. N 6. P. 613–628.
18. *Suzuki J.* Microvascular remodelling after endurance training with Co<sup>2+</sup> treatment in the rat diaphragm and hind-leg muscles // *Jpn. J. Physiol.* 2002. Vol. 52. N 5. P. 409–419.
19. *Gute D., Fraga C., Laughlin M.H., Amann J.F.* Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats // *J. Appl. Physiol.* 1996. Vol. 81. N 2. P. 619–626.
20. *Green H.J., Phyley M.J., Smith D.M., Kile J.G.* Extreme endurance training and fiber type adaptation in rat diaphragm // *J. Appl. Physiol.* 1989. Vol. 66. N 4. P. 1914–1920.
21. *Gosselin L.E., Betlach M., Vailas A.C., Thomas D.P.* Training-induced alterations in young and senescent rat diaphragm muscle // *J. Appl. Physiol.* 1992. Vol. 72. N 4. P. 1506–1511.
22. *Domínguez-Álvarez M., Gea J., Barreiro E.* Inflammatory events and oxidant production in the diaphragm, gastrocnemius, and blood of rats exposed to chronic intermittent hypoxia: therapeutic strategies // *J. Cell. Physiol.* 2017. Vol. 232. N 5. P. 1165–1175.
23. *Armstrong R.B., Laughlin M.H.* Metabolic indicators of fibre recruitment in mammalian muscles during locomotion // *J. Exp. Biol.* 1985. Vol. 115. P. 201–213.
24. *Joyner M.J., Casey D.P.* Regulation of increased blood flow (Hyperemia) to muscles during exercise: A hierarchy of competing physiological needs // *Physiol. Rev.* 2015. Vol. 95. N 2. P. 549–601.
25. *Murrant C.L., Sarelius I.H.* Local control of blood flow during active hyperaemia: What kinds of integration are important? // *J. Physiol.* 2015. Vol. 593. N 21. P. 4699–4711.
26. *Sexton W.L., Poole D.C.* Costal diaphragm blood flow heterogeneity at rest and during exercise // *Respir. Physiol.* 1995. Vol. 101. N 2. P. 171–182.
27. *Laughlin M.H., Armstrong R.B.* Rat muscle blood flows as a function of time during prolonged slow treadmill exercise // *Am. J. Physiol.* 1983. Vol. 244. N 6. P. H814–824.
28. *Sarelius I., Pohl U.* Control of muscle blood flow during exercise: local factors and integrative mechanisms // *Acta Physiol. (Oxf.).* 2010. Vol. 199. N 4. P. 349–365.
29. *Bagher P., Segal S.S.* Regulation of blood flow in the microcirculation: Role of conducted vasodilation // *Acta Physiologica.* 2011. Vol. 202. N 3. P. 271–284.
30. *Мелькумянц А.М.* О роли эндотелиального гликокаликса в механогенной регуляции сопротивления артериальных сосудов // *Успехи физиол. наук.* 2012. Т. 43. № 4. С. 45–58.
31. *Fixler D.E., Atkins J.M., Mitchell J.H., Horwitz L.D.* Blood flow to respiratory, cardiac, and limb muscles in dogs during graded exercise // *Am. J. Physiol.* 1976. Vol. 231. N 5. P. 1515–1519.
32. *Manohar M.* Inspiratory and expiratory muscle perfusion in maximally exercised ponies // *J. Appl. Physiol.* 1990. Vol. 68. N 2. P. 544–548.
33. *Nobrega A.C.L., O’Leary D., Silva B.M., Marongiu E., Piepoli M.F., Crisafulli A.* Neural regulation of cardiovascular response to exercise: role of central command and peripheral afferents // *Biomed Res. Int.* 2014. Vol. 2014. P. 478965.

34. O'Leary D.S., Robinson E.D., Butler J.L. Is active skeletal muscle functionally vasoconstricted during dynamic exercise in conscious dogs? // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272. N 1. P. R386–R391.
35. Manohar M. Vasodilator reserve in respiratory muscles during maximal exertion in ponies // *J. Appl. Physiol.* (1985). 1986. Vol. 60. N 5. P. 1571–1577.
36. Sheel A.W., Boushel R., Dempsey J.A. Competition for blood flow distribution between respiratory and locomotor muscles: Implications for muscle fatigue // *J. Appl. Physiol.* 2018. Vol. 125. N 3. P. 820–831.
37. Dempsey J.A., Romer L., Rodman J., Miller J., Smith C. Consequences of exercise-induced respiratory muscle work // *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2006. Vol. 151. N 2–3. P. 242–250.
38. Laughlin M.H., Armstrong R.B. Adrenoreceptor effects on rat muscle blood flow during treadmill exercise // *J. Appl. Physiol.* 1987. Vol. 62. N 4. P. 1465–1472.
39. Behnke B.J., Armstrong R.B., Delp M.D. Adrenergic control of vascular resistance varies in muscles composed of different fiber types: Influence of the vascular endothelium // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. Vol. 301. N 3. P. R783–R790.
40. Hilton S.M., Jeffries M.G., Vrbová G. Functional specializations of the vascular bed of soleus // *J. Physiol.* 1970. Vol. 206. N 3. P. 543–562.
41. Aaker A., Laughlin M.H. Diaphragm arterioles are less responsive to alpha1- adrenergic constriction than gastrocnemius arterioles // *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 92. N 5. P. 1808–1816.
42. Laughlin M.H., Woodman C.R., Schrage W.G., Gute D., Price E.M. Interval sprint training enhances endothelial function and eNOS content in some arteries that perfuse white gastrocnemius muscle // *J. Appl. Physiol.* 2004. Vol. 96. N 1. P. 233–244.
43. Van Teeffelen J.W.G.E., Segal S.S. Interaction between sympathetic nerve activation and muscle fibre contraction in resistance vessels of hamster retractor muscle // *J. Physiol.* 2003. Vol. 550. N. 2. P. 563–574.
44. McCurdy M.R., Colleran P.N., Muller-Delp J., Delp M.D. Effects of fiber composition and hindlimb unloading on the vasodilator properties of skeletal muscle arterioles // *J. Appl. Physiol.* 2000. Vol. 89. N 1. P. 398–405.
45. Schwartz L.M., McKenzie J.E. Adenosine and active hyperemia in soleus and gracilis muscle of cats // *Am. J. Physiol.* 1990. Vol. 259. N 4. P. H1295–H1304.
46. Muller-Delp J.M., Spier S.A., Ramsey M.W., Delp M.D. Aging impairs endothelium-dependent vasodilation in rat skeletal muscle arterioles // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. Vol. 283. N 4. P. H1662–H1672.
47. Aaker A., Laughlin M.H. Differential adenosine sensitivity of diaphragm and skeletal muscle arterioles // *J. Appl. Physiol.* 2002. Vol. 93. N 3. P. 848–856.
48. Гайнуллина Д.К., Кирюхина О.О., Тарасова О.С. Оксид азота в эндотелии сосудов: регуляция продукции и механизмы действия // *Успехи физиол. наук.* 2013. Т. 44. № 4. С. 88–102.
49. McAllister R.M. Endothelium-dependent vasodilation in different rat hindlimb skeletal muscles // *J. Appl. Physiol.* 2003. Vol. 94. N 5. P. 1777–1784.
50. Copp S.W., Holdsworth C.T., Ferguson S.K., Hirai D.M., Poole D.C., Musch T.I. Muscle fibre-type dependence of neuronal nitric oxide synthase-mediated vascular control in the rat during high speed treadmill running // *J. Physiol.* 2013. Vol. 591. N 11. P. 2885–2896.
51. Shipley R.D., Kim S.J., Muller-Delp J.M. Time course of flow-induced vasodilation in skeletal muscle: contributions of dilator and constrictor mechanisms // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005. Vol. 288. N 4. P. H1499–H1507.
52. Александрова Н.П., Баранов В.М., Тихонов М.А., Колесников В.И., Котов А.Н., Кочанов В.С. Влияние антиортостатической гипокинезии на функциональное состояние диафрагмы у крыс // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2005. Vol. 91. N 11. P. 1312–1319.
53. Neder J.A., Marillier M., Bernard A., Matthew J.D., Kathryn M.M., O'Donnell D.E. The integrative physiology of exercise training in patients with COPD // *COPD.* 2019. Vol. 16. N 2. P. 182–195.
54. Illi S.K. Held U., Frank I., Spengler C.M. Effect of respiratory muscle training on exercise performance in healthy individuals: A systematic review and meta-analysis // *Sports Med.* 2012. Vol. 42. N 8. P. 707–724.

Поступила в редакцию 22.03.2020 г.

После доработки 05.05.2020 г.

Принята в печать 17.05.2020 г.

## REVIEW

# Diaphragm: relationship between the regulation of blood supply and the characteristics of the contractile function

A.A. Borzykh<sup>1,\*</sup>, O.L. Vinogradova<sup>1,2</sup>, O.S. Tarasova<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Exercise Physiology, Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Khoroshevskoe shosse 76A, Moscow, 123007 Russia;

<sup>2</sup>Department of Ecological and Extreme Medicine, Faculty of Basic Medicine, Lomonosov Moscow State University, Lomonosovskiy prospect 27–1, Moscow, 119991, Russia;

<sup>3</sup>Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: borzykh.anna@gmail.com

The diaphragm is a unique skeletal muscle, it is active throughout the life and therefore differs from locomotor muscles in the properties of muscle fibers and the mechanisms blood supply control. In this review, we aimed to survey the structural characteristics of diaphragm muscle

tissue, which provide its integral contractile properties, to compare the activity of vascular tone control mechanisms in the diaphragm and locomotor muscles and to explore their relationship with the regulation of contractile function. The diaphragm differs from most other skeletal muscles with a high content of both slow, fatigue-resistant muscle fibers of type I and fast fibers of type IIb, which provides endurance and high speed-power characteristics of the diaphragm. The muscle fibers in the diaphragm are smaller, and the density of capillarization is much higher than in locomotor muscles. Arteries and arterioles that regulate blood supply to the diaphragm capillary bed combine the properties of arteries from muscles composed mainly of oxidative or glycolytic fibers, which provides blood flow in the diaphragm, adequate to its functional load with various patterns of activity. Compared to locomotor muscles, the mechanisms of vasoregulation in the diaphragm can qualitatively differ in the proximal and distal parts of the vascular bed. The functional properties of the proximal arteries can be explained, in particular, by their proximity to the aorta and their small length. The contractile characteristics and blood supply of the diaphragm in various conditions should be taken into account when conducting respiratory muscle training in sports and rehabilitation medicine.

**Keywords:** *myosin heavy chain isoforms, metabolic types of muscle fibers, respiratory muscles, resistance arteries, hyperemia, sympathetic nervous system, nitric oxide*

#### **Сведения об авторах**

*Борзых Анна Анатольевна* — канд. биол. наук, науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН. Тел.: 8-499-195-67-15; e-mail: [borzykh.anna@gmail.com](mailto:borzykh.anna@gmail.com)

*Виноградова Ольга Леонидовна* — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН, проф. кафедры экстремальной и экологической медицины факультета фундаментальной медицины МГУ. Тел.: 8-499-195-68-07; e-mail: [microgravity@mail.ru](mailto:microgravity@mail.ru)

*Тарасова Ольга Сергеевна* — докт. биол. наук, доц., вед. науч. сотр. лаб. физиологии мышечной деятельности ГНЦ РФ ИМБП РАН, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-16; e-mail: [ost.msu@gmail.com](mailto:ost.msu@gmail.com)

## ОБЗОР

УДК 591.13+613.24

**Обестатин и его фрагменты:  
новый подход к регуляции массы тела в норме и при патологии****А.В. Граф<sup>1,2</sup>, Е.Э. Хиразова<sup>1</sup>, М.В. Маслова<sup>1,\*</sup>, Н.А. Соколова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup> Институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий, Московский физико-технический институт, Россия, 123098, г. Москва, ул. Максимова, д. 4  
\*e-mail: maslova\_masha@mail.ru

Заболевания органов желудочно-кишечного тракта и расстройства пищевого поведения относятся к числу наиболее распространенных патологий в мире. Одним из наиболее распространенных и опасных последствий многих расстройств пищевого поведения является неконтролируемый набор массы тела, часто приводящий к развитию ожирения. Обзор посвящен 15-летним исследованиям обестатина – одного из регуляторов пищевого поведения. Этот пептид состоит из 23 аминокислотных остатков и является продуктом процессинга гена препрогрелина, ответственного также за кодирование орексигенного белка – грелина. Обестатин и грелин обладают разной физиологической активностью, в том числе – в регуляции системы аппетита. Первоначально обестатин был выделен из клеток слизистой оболочки желудка у крыс, но последующие исследования показали, что он может экспрессироваться во многих тканях организма и обладает широким спектром действия на различные органы и ткани. Обзор сконцентрирован на тех эффектах данного пептида, которые приводят к подавлению системы аппетита, а также на возможных механизмах его анорексигенного действия в организме. Несмотря на 15 лет исследований обестатина, его действие на различные органы и ткани, а в особенности – механизмы анорексигенного действия, вызывают много споров и дискуссий. Это в первую очередь связано с неоднозначностью определения рецепторов пептида, а также вероятной деградацией молекулы на небольшие фрагменты, которые, в свою очередь, могут оказывать собственные влияния. Локальные эффекты обестатина и его производных в периферических тканях, а также возможное действие на центральном уровне свидетельствуют о перспективности данных пептидов для дальнейших исследований. Их, в частности, можно рассматривать как потенциальные терапевтические агенты для коррекции ряда расстройств пищевого поведения. Целью данной работы было описать актуальность решения проблемы повышенной массы, а также обобщить результаты многочисленных исследований одного из регуляторов аппетита, обестатина, и его фрагментов, попытаться объяснить механизмы развития их эффектов.

**Ключевые слова:** обестатин, регуляторы пищевого поведения, расстройства аппетита, орексигенные пептиды, анорексигенные пептиды, ожирение

**1. Общий взгляд на проблему нарушения  
пищевого поведения**

Заболевания органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и расстройства пищевого поведения относятся к числу наиболее распространенных патологий в мире. Ежегодный прирост количества пациентов с патологией ЖКТ в среднем составляет 1,14 на 1000 человек в год, а по прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) к середине XXI в. заболевания органов пищеварения будут занимать одно из ведущих мест, уже сейчас затрагивая с разной степенью тяжести по одним данным – 15–25% взрослого трудоспособного населения, по другим – более 50–60% [1].

Основными факторами риска проявления и развития различных патологий пищеварительной системы помимо наследственных считается большое количество стрессорных факторов в современном обществе, приводящие к нарушению режима питания, снижению качества питания (перекусы «на ходу», «фаст-фуды» и пр.), гиподинамия, плохая экология и употребление некачественных продуктов питания.

Не только физическое, но и психическое здоровье человека во многом зависит от состояния и работы ЖКТ, нарушение нормального функционирования которого является основой многих проблем со здоровьем в современном обществе. Так, долгое время нарушения пищевого поведения рассматривались только как медицин-

ский диагноз или генетическая склонность, однако теперь эту проблему изучают и лечат как психические расстройства. Нарушения пищевого поведения — группа поведенческих расстройств, характеризующихся выраженной озабоченностью массой и формами собственного тела, сопровождающейся чрезмерными попытками их контроля. Чаще всего в контексте словосочетания «расстройства пищевого поведения» рассматривают такие заболевания, как нервная анорексия, нервная булимия, психогенное переедание, а также неуточненные расстройства, которые диагностируются примерно в 40–50% всех случаев нарушений пищевого поведения. По данным клинических исследований в 2001–2003 гг. частота встречаемости патологий разного типа расстройств пищевого поведения среди женщин и мужчин составляла соответственно: 0,9% и 0,3% для нервной анорексии, 1,5% и 0,5% в случае булимии, 3,5 и 2,0% для расстройств по типу неконтролируемого переедания, 4,5% и 4% в случае пищевых расстройств неуточненной этиологии [2]. Высокая степень распространения усугубляется тем, что в 90% случаев эти патологии возникают еще в подростковом возрасте; до 95% среди общего числа пациентов составляют молодые женщины [2, 3]. Эти патологии часто характеризуются тяжелыми расстройствами психики, ведущими к катастрофическим последствиям для нормального функционирования тела человека. Так, нервная анорексия обладает одним из самых высоких уровней смертности среди всех психических нарушений, при этом гибель организма наступает как вследствие физиологических нарушений, так и по причине самоубийств вследствие отягощенных депрессивных состояний [2, 4].

Социальное значение заболеваний органов пищеварения и расстройств пищевого поведения определяется не только высокой степенью их распространения, но и хроническим рецидивирующим течением; они часто приводят к длительной нетрудоспособности, а порой и инвалидности, влекут за собой большие прямые и косвенные экономические затраты.

## 2. Проблема ожирения в современном мире

Одним из наиболее распространенных и опасных последствий многих расстройств пищевого поведения (за исключением нервной анорексии) является неконтролируемый набор массы тела, часто приводящий к развитию ожирения. ВОЗ определяет избыточный вес и ожирение как «патологическое или чрезмерное накопление жира и жировых отложений, которые могут наносить вред здоровью» и рассматривает распространение этих заболеваний как пандемию, охватывающую миллионы людей. Ожирением по данным ООН к 2018 г. страдали в мире около 15% взрослых,

5,9% всех детей в возрасте до пяти лет и порядка 7% детей и подростков в возрасте от 5 до 19 лет (доклад Экономического и социального совета ООН о ходе выполнения Целей устойчивого развития до 2030 г.). По оценкам ВОЗ эти цифры составляют 650 млн пациентов с диагностированным ожирением среди взрослых и 340 млн — среди детей [5].

Опасным фактором является то, что избыточная масса и ожирение связаны с большим количеством различных осложнений, затрагивающих многие органы и системы органов. По данным ВОЗ, избыточная масса тела и ожирение определяют развитие до 57% всех случаев сахарного диабета 2-го типа, 23% случаев ишемической болезни сердца, 17% — артериальной гипертензии, 30% — желчнокаменной болезни, 14% — остеоартрита, а также повышают риск развития нарушений в репродуктивной сфере и повышают риск развития онкологических заболеваний [6]. Избыточный вес и ожирение являются 5-м в мире по частоте случаев фактором риска смерти. По данным ВОЗ ожирение легкой степени уменьшает продолжительность жизни в среднем на 3–5 лет, сильное ожирение — до 15 лет: ожирение в 4 раза увеличивает риск смертности от сердечно-сосудистых заболеваний и в 2 раза от онкологии [7, 8]. Около 2,8 млн взрослых людей ежегодно умирают по причине излишней массы тела и ожирения [9].

Причина развития ожирения — дисбаланс между потребляемой и расходуемой энергией, в основе которого лежат нарушения метаболизма, употребление высококалорийной пищи, нарушение поведенческих реакций, влияние внешних факторов, а также генетическая предрасположенность. В частности, развитие ожирения на 35–80% зависит от 32 ключевых генов, большинство из которых экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС). Эти ключевые гены обеспечивают функционирование систем положительного подкрепления и контроля аппетита по принципу обратной связи [10, 11]. Согласно данным ВОЗ, идентифицированы более 80 факторов окружающей среды и образа жизни, способствующие развитию ожирения, некоторые из которых представлены в табл. 1.

Ожирение — это не только глобальная медицинская, но это еще и огромная социально-экономическая проблема. Многие пациенты страдают не только от болезней, но и от многочисленных неврологических расстройств: заниженная самооценка, депрессия, эмоциональный дистресс и другие психологические проблемы. При этом, по данным международной консалтинговой компании McKinsey Global Institute, мировая экономика ежегодно теряет около 2 трлн долларов, которые уходят на решение проблем, прямо или косвенно связанных с ожирением.

Таблица 1

Факторы, определяющие развитие избыточной массы тела и/или ожирения

Физиологические	Генетические	Социально-экономические
Потребление большого количества энергетически богатой пищи (в том числе содержащей чрезмерное количество жиров растительного и животного происхождения)	Генетические маркеры – аллели некоторых генов, в том числе FTO, BDNF, NEGR1, MC2R и пр. [12]	Повышенная стрессированность
Недостаток физической активности	Нарушение сигналинга лептина [13]	Низкий статус человека в обществе
Ожирение как последствие заболеваний (например, болезнь Кушинга)	Нарушения в работе пептида Y, грелина и прочих сигнальных соединений [11]	
Психологическое состояние		
Нарушение сна		
Применение лекарств на основе стероидов		

Условные обозначения: FTO – ген, ассоциированный с жировой тканью и ожирением; BDNF – нейротропный фактор мозга; NEGR1 – нейронный регулятор роста 1; MC2R – меланокортиновый рецептор 2-го типа.

Ожирение сейчас является важнейшей глобальной проблемой, требующей комплексного всеобъемлющего вмешательства. И одним из путей решения этой проблемы может стать регуляция системы аппетита, а значит, пищевого поведения.

### 3. Регуляция пищевого поведения – перспективное направление лечения пищевых расстройств

Регуляция пищевого поведения – комплексный физиологический процесс. Причем регуляция осуществляется как периферическими (растяжение стенок желудка и кишечника, обнаружение в химусе продуктов распада определенных соединений, уровень глюкозы в крови и др.), так и центральными механизмами. Важная роль в координации регуляторных механизмов отводится целому ряду эндогенных сигнальных соединений, которые в перспективе могут рассматриваться в качестве ключевых мишеней фармакологических воздействий.

Сигнальные соединения – регуляторы системы аппетита – можно разделить на две основные группы: орексигенные (возбуждающие аппетит) и анорексигенные (подавляющие аппетит) [14].

Регуляторы аппетита экспрессируются как на уровне желудочно-кишечного тракта, так и в ЦНС. В ЦНС в регуляции пищевого поведения участвует целый ряд структур, однако основные процессы протекают в гипоталамусе, куда поступает информация от механорецепторов о степени растяжения стенок различных отделов ЖКТ, об уровне метаболитов в крови и химусе (глюкозы, аминокислот и др.), эндокринных факторах и других различных сигнальных соединений в крови. Так, при голодании в аркуатном ядре гипоталамуса (ARC) изменяется активность нейронов, коэкспрессирующих орексигенные регуляторы, к которым относятся нейропептид Y (NPY) и агутиродственный пептид (AgRP). Изменяется и активность нейронов, коэкспрессирующих анорексигенные регуляторы:  $\alpha$ -меланоцитстимули-

рующий гормон ( $\alpha$ -MSH) и кокаин-амфетамин-регулируемый транскрипт (CART) [15].

В регуляции потребления пищи участвуют и другие гипоталамические ядра. Известно, что разрушение дорсомедиального (DMN) и вентромедиального (VMN) ядер, входящих в «центр насыщения», приводит к ожирению, а разрушение латерального гипоталамуса (LH; «центра голода») вызывает афагию, тогда как его стимуляция повышает потребление пищи.

Изменения потребления пищи происходят и при разрушении супрахиазматического (SCN) и паравентрикулярного ядер (PVN), околосоудного гипоталамуса (PHF). Кроме того, показано, что эти области имеют разную чувствительность к действию орексигенных и анорексигенных веществ [14].

Известно довольно много пептидных гормонов гипоталамуса, которые прямо или косвенно влияют на пищевое поведение. Регуляция аппетита мозгом напрямую зависит от сигналов, поступающих с периферии, в особенности – из ЖКТ. Механорецепторы в полых органах ЖКТ сигнализируют о степени растяжения стенок, то есть о наполненности желудка и кишечника. Далее эти сигналы передаются в гипоталамические центры голода и насыщения и изменяют их активность. Кроме того, в ЖКТ также происходит синтез многих гормональных и эндокринных факторов, участвующих в регуляции аппетита. Среди них пептид YY (PYY), глюкагоноподобный пептид 1 (GLP-1), оксинтомодулин (ОХМ). Эти регуляторы вызывают снижение пищевой мотивации и задержку опорожнения желудка. Холецистокинин, гуанидин и панкреатический полипептид (PP) являются анорексигенными веществами. Амилин и инсулин, вырабатываемые в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, вызывают снижение уровня глюкозы в крови и подавляют пищевую мотивацию. Грелин, в свою очередь, является стимулятором аппетита [16].

На рис. 1 представлена обобщенная схема регуляции пищевого поведения.

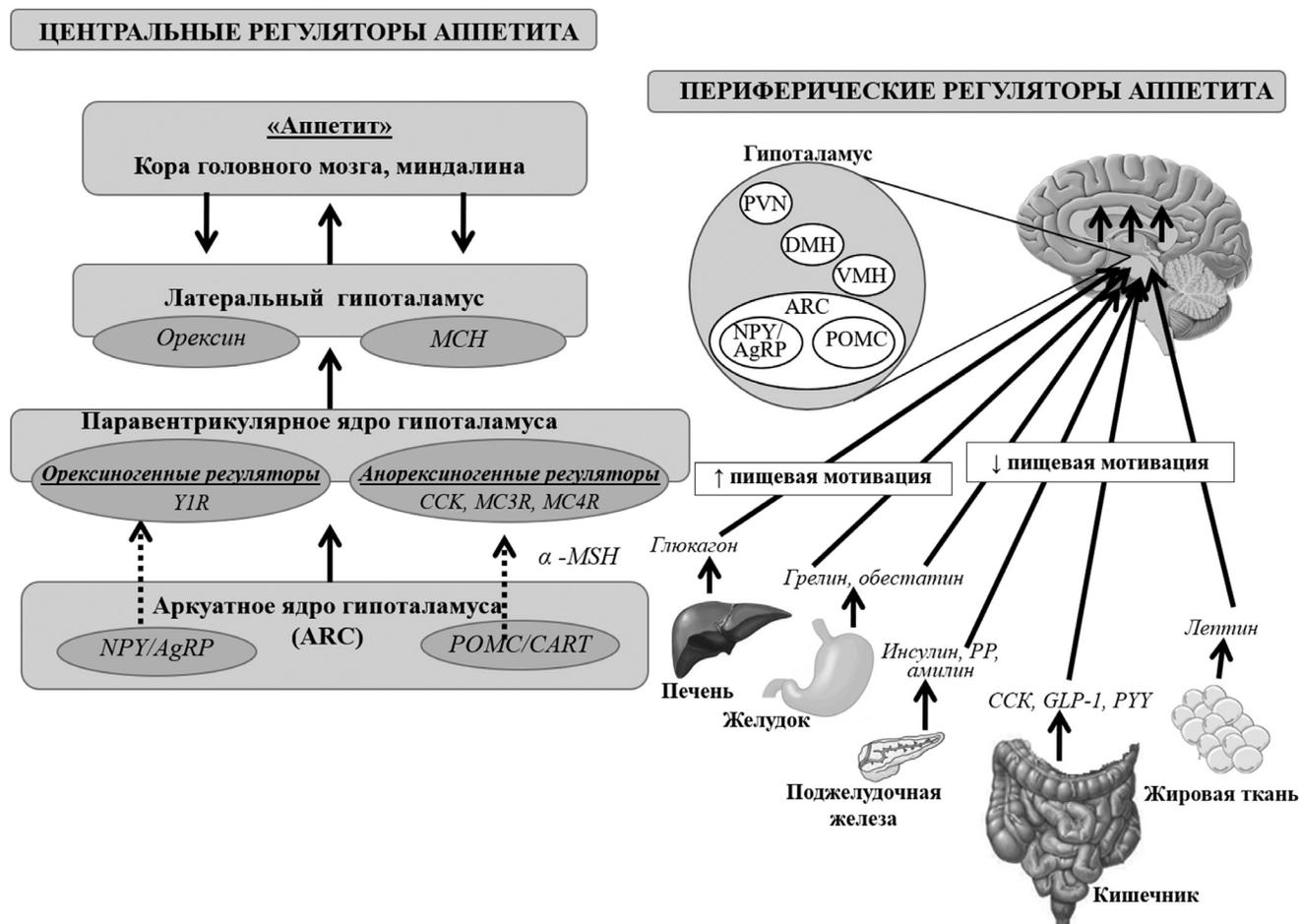


Рис. 1. Обобщенная схема регуляции пищевой мотивации при помощи некоторых пептидных регуляторов

Условные обозначения: MCH – меланин-концентрирующий гормон; AgRP – агуртиродственный пептид; NPY – нейропептид Y; PP – панкреатический полипептид; GLP-1 – глюкагоноподобный пептид 1; OXM – оксинтомодулин; PYY – пептид YY;  $\alpha$ -MSH –  $\alpha$ -меланоцитстимулирующий гормон; MC3R – меланокортиновый рецептор 3-го типа; MC4R – меланокортиновый рецептор 4-го типа; CCK – холецистокинин; Y1R – рецептор 1-го типа к нейропептиду Y; POMC – проопиомеланокортин и его производные; CART – кокаин-амфетамин-регулируемый транскрипт; DMN – дорсомедиальное ядро гипоталамуса; VMN – вентромедиальное ядро гипоталамуса; PVN – паравентрикулярное ядро гипоталамуса.

#### 4. Обестатин – эндогенный регулятор аппетита и массы тела

##### 4.1. Структура обестатина и его распределение в организме

Изучение механизмов действия и содержания гормонов, регулирующих пищевое поведение, является одним из наиболее перспективных направлений в разработке новых подходов к созданию лекарственных препаратов, направленных на лечение ожирения – как диетиндуцированного, так и связанного с различными патологическими состояниями, при которых имеют место метаболические, гормональные и энергетические нарушения. В связи с этим вполне оптимистичным представляется использование гормонов пищевого поведения или их аналогов для регуляции и коррекции патогенетических механизмов метаболических расстройств.

Среди эндогенных регуляторов аппетита, открытых за последние 15 лет, особый интерес

представляет обестатин. Обестатин («*obedere*» – поглощать и «*statin*» – подавлять) состоит из 23 аминокислотных остатков и является одним из продуктов посттрансляционного процессинга препрогрелина – предшественника грелина, «гормона голода», периферическое (системное) и центральное (внутрижелудочковое) введение которого приводит к быстрой стимуляции пищевого поведения и увеличению массы тела, а также стимулирует сокращение стенок желудка и секрецию кислоты [17].

Аминокислотная последовательность обестатина у разных видов животных достаточно консервативна. У человека и приматов аминокислотные последовательности пептида полностью совпадают, тогда как сходство с обестатином крыс, мышей, собак и кошек составляет 87%. При этом среди неконсервативных аминокислот существуют пары, которые структурно или биохимически схожи (например, аланин-3/валин-3, лейцин-11/изолейцин-11, серин-12/треонин-12

и глутамин-18/глутаминовая кислота-18), что ещё сильнее подчеркивает сохраняющуюся природу этого пептида [18] (табл. 2). С-конец обестатина трансляционно модифицирован амидной группой на Leu-23, что, вероятно, имеет функциональное значение: первоначально предполагалось, что это необходимо для связывания пептида с рецептором [19], но затем было показано, что это важно для стабилизации общей конформации пептидной молекулы [20]. В табл. 2 представлены данные аминокислотного состава обестатина у разных организмов в сравнении со структурой обестатина человека.

Впервые обестатин был выделен из желудка крысы, где синтезируется в относительно большом количестве [19]. Также было показано, что внутриклеточная локализация обестатина и грелина одинакова: это означает, что обестатин и грелин содержатся в одних и тех же везикулах [21]. Позднее было выявлено, что обестатин секретируется главным образом в клетках слизистой ЖКТ, при этом он также был найден в яйцках, клетках скелетной мускулатуры, легких, жировой ткани, печени, клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, молочных железах, а также в сперме, грудном молоке, слюне и плазме крови [21–28]. В ЖКТ человека иммунореактивные к обестатину клетки обнаружены в слизистой от кардиального сфинктера желудка до подвздошной кишки в следующем распределении: больше всего соответствующих клеток сконцентрировано в области желудка, меньше – в двенадцатиперстной и тощей кишках, мало клеток в подвздошной кишке, а в толстой кишке подобных клеток не обнаружено [21, 29]. Эти данные примерно соотносятся с распределением клеток, иммунореактивных к грелину, в пищева-

рительном тракте [21, 30]. В слизистой оболочке желудка иммунореактивные к обестатину клетки идентифицированы по большей части в области дна и в меньшей степени – в теле и пилорическом отделе [25, 30, 31]. Кроме того, обестатин с различной интенсивностью экспрессируется не только в клетках слизистой оболочки желудка, но и в ганглиях энтеральной нервной системы. Распределение обестатина в клетках Ауэрбахового сплетения, которое контролирует моторную активность ЖКТ, может являться одним из факторов действия данного пептида на скорость опорожнения отделов пищеварительного тракта [29].

#### 4.2. Влияние обестатина на функциональную активность желудочно-кишечного тракта

Одним из самых первых зарегистрированных эффектов обестатина было подавление сокращения изолированных мышц тощей кишки [19]. Такое действие рассматривали как потенциальный механизм уменьшения потребления пищи и массы тела. Впоследствии были получены данные, которые как подтверждали эту теорию [32–37], так и оспаривали ее [38–41]. Такие противоречия в полученных различными исследователями результатах могут быть связаны с небольшим периодом распада обестатина в крови, его низкой концентрацией и стабильностью или плохой очисткой при синтезе [42]. Так, при внутривенном введении 10 мкг обестатина период его полураспада составляет 22 мин [39]. Физиологические концентрации обестатина достаточно низки: у крыс в плазме крови содержание пептида составляет  $\leq 0,2$  фмоль/мл, в желудке – 0,18 фмоль/мл, у человека эти значения достигают 6,9 фмоль/мл и 0,17 фмоль/мл соответственно [43], тогда как по другим данным содержание обестатина в плазме

Таблица 2

Сравнение структуры обестатина человека и разных животных (модифицировано и дополнено по Грин и Грейв [18]): серым выделены аминокислоты в структуре обестатинов, отличающиеся от соответствующих аминокислот обестатина человека

Вид	№ аминокислоты										N-конец										C-конец										Сходство, %
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23								
Человек	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	V	Q	Y	Q	Q	H	S	Q	A	L								
Обезьяна	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	V	Q	Y	Q	Q	H	S	Q	A	L	100							
Мышь	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	A	Q	Y	Q	Q	H	G	R	A	L	87							
Крыса	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	A	Q	Y	Q	Q	H	G	R	A	L	87							
Собака	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	P	Q	Y	H	Q	H	G	Q	A	L	87							
Кошка	F	N	A	P	F	D	V	G	I	K	L	S	G	A	Q	Y	H	Q	H	G	Q	A	L	87							
Свинья	F	N	A	P	C	D	V	G	I	K	L	S	G	A	Q	S	D	Q	H	G	Q	P	L	74							
Козел	F	N	A	P	F	N	I	G	I	K	L	S	G	A	Q	S	L	Q	H	G	Q	T	L	70							
Овца	F	N	A	P	F	N	I	G	I	K	L	S	G	A	Q	S	L	Q	H	G	Q	T	L	70							
Корова	F	N	A	P	F	N	I	G	I	K	L	A	G	A	Q	S	L	Q	H	G	Q	T	L	65							
Эму	F	N	V	P	F	E	I	G	V	K	I	T	E	E	Q	Y	Q	E	Y	G	Q	M	L	48							
Курица	F	N	V	P	F	E	I	G	V	K	I	T	E	R	E	Y	Q	E	Y	G	Q	A	L	43							
Гусь	F	N	V	P	F	E	I	G	V	K	I	T	E	E	E	Y	Q	E	Y	G	Q	T	L	43							
Утка	F	H	V	P	F	E	I	G	V	K	I	T	E	E	E	Y	Q	E	Y	G	Q	T	L	39							

крови у крыс может составлять 317 фмоль/мл [39], а у человека 288–830 пг/мл [44, 45]. Секретция обестатина имеет суточные колебания, сходные с этими показателями для грелина и соматостатина, однако концентрации грелина и обестатина в плазме не взаимосвязаны. Кроме того, количество актов секреции обестатина может оказаться меньше, чем у грелина и соматостатина [39]. Секретция обестатина не зависит от калорийности диеты [43, 46], а также от чувства голода или сытости [46]. Обестатин ингибирует моторику антрального отдела желудка после принятия пищи; на фоне голодания данный эффект не проявляется [47]. В продольных гладкомышечных клетках дна желудка обестатин может снижать проводимость покоящейся специфической мембраны, ингибировать вход  $\text{Ca}^{2+}$  и, таким образом, повышать пороговое значение потенциалов действия [48], что в итоге приводит к снижению сократительной активности желудка. Наблюдается зависимость между влиянием обестатина на сократимость кишечника, особенно в области тощей кишки, и возрастом животного: чем старше животное, тем менее заметен эффект пептида [47]. Предполагается, что в двенадцатиперстной кишке эффекты обестатина реализуются посредством афферентных путей блуждающего нерва, а также рецепторов кортикотропин- рилизинг-фактора типа 1 и типа 2 (CRF1, CRF2) в головном мозге, что говорит о множестве вероятных путей действия пептида [29]. Энтеральное введение обестатина влияет на регенерацию слизистой оболочки кишечника [49]. Доказательств экспрессии обестатина в области толстого кишечника нет, как и нет данных, доказывающих влияние пептида на моторику данного отдела пищеварительного тракта, что может быть связано с отсутствием специфических рецепторов или распределением нервных сплетений [29]. В то же время было показано, что обестатин может содержаться в слюне, хотя при этом его влияния на секрецию слюнных желез не обнаружено [50]. Также не выявлено прямого влияния обестатина на секрецию желудочного сока. Однако было отмечено, что обестатин в концентрациях 0,1–10 нМ подавляет секрецию соматостатина в поджелудочной железе *in vitro*. Соматостатин, в свою очередь, регулирует секрецию гастроинтестинальных гормонов, в частности, гастрин [51]. Таким образом, можно предположить, что и обестатин опосредованно через действие других гормонов может влиять на секрецию пищеварительных соков.

В островках Лангерганса поджелудочной железы обестатин колокализуется с грелином [52], что способствовало развитию теории о потенциальном терапевтическом действии обестатина на островковые клетки поджелудочной железы. Так, в работах Венсонга было показано влияние обестатина на увеличение секреции инсулина за счет

ингибирования апоптоза  $\beta$ -клеток и снижения секреции глюкагона путем ингибирования пролиферации  $\alpha$ -клеток при диабете 2-го типа [53, 54]. Также было показано, что обестатин может влиять на увеличение секреции инсулина за счет увеличения числа инсулин-продуцирующих клеток в поджелудочной железе [55].

#### 4.3. Обестатин и патологии, ассоциированные с органами ЖКТ

Анализ содержания обестатина в плазме крови при различных физиологических состояниях показал, что у людей, страдающих ожирением, в частности, на фоне диабета 2-го типа, уровень обестатина существенно ниже, а у больных анорексией — значительно выше, чем у здоровых пациентов [46, 56, 57]. Уровень обестатина также понижен у пациентов с метаболическим синдромом, но повышен у больных со стеатогепатитом и синдромом Барде-Бидля [58, 59].

Развитие патологий ЖКТ, в частности, язвенной болезни, часто связывают с *Helicobacter pylori*, при этом развитие данной инфекции имеет связь и с изменением концентрации обестатина [45]. Этот факт дает основания полагать, что правильная регуляция уровня обестатина в моделях язвенной болезни может ускорить процесс коррекции патологии [60].

В модели некротизирующего язвенного колита обестатин снижал площадь некротизирующего очага [61], а предварительное введение обестатина значительно уменьшало площадь повреждения слизистой оболочки толстой кишки при аппликации уксусной кислоты в модели острого колита [62]; это позволяет предполагать, что он обладает антиапоптотическим и противовоспалительным действием. Существуют также данные, свидетельствующие о гепатопротекторных свойствах обестатина. Так, у животных, находящихся на высокожировой диете, хроническое внутрибрюшинное введение обестатина (80 нмоль/кг) существенно замедляло течение неалкогольной жировой болезни печени, уменьшало развитие гепатомегалии и гиперлипидемии, замедляло накопление липидов в печени и формирование инсулинорезистентности [63]. Авторы связывают такой эффект обестатина с изменением активности грелина, адипонектина, а также снижением количества потребляемого корма на фоне введения пептида.

Обестатин может выступать в качестве маркера при диагностике заболеваний поджелудочной железы. Так, при развитии панкреатита у людей наблюдается увеличение концентрации обестатина в сыворотке, причем содержание пептида прямо зависит от тяжести течения заболевания [64].

Кроме того, обестатин может участвовать в процессе регенерации поджелудочной железы, в частности, улучшая восстановление островко-

вых кластеров и повышая экспрессию генов инсулина во время дифференцировки эндокринных клеток-предшественников поджелудочной железы [53]. Также показано, что введение обестатина существенно подавляет гибель островковых клеток в модели диабета, увеличивает экспрессию инсулина и уменьшает выброс глюкагона, что делает возможным рассмотрение пептида также в качестве потенциального средства для лечения диабета 2-го типа [63].

#### 4.4. Обестатин и аппетит

В ряде исследований было показано, что при введении в различных дозах обестатин приводит к снижению массы тела, потребления корма и воды. Было выявлено, что однократное внутрибрюшинное введение обестатина (1 мкмоль/кг) вызывает снижение потребления пищи у грызунов (крыс и мышей), аналогичный результат получен на мышах после внутрижелудочкового введения обестатина (8 нмоль/кг) [19]. Кроме того, обестатин вызывает подобный эффект и при хроническом введении [19, 34]. Также показано, что внутрибрюшинное введение обестатина в дозе 1 мкмоль/кг уменьшает орексигенный эффект грелина [39]. Существует большое количество данных, подтверждающих анорексигенное действие обестатина [32, 65, 66]. Однако в исследовании других авторов ни однократная подкожная инфузия обестатина в дозе до 500 нмоль/кг, ни ежедневное введение вещества в течение 7 сут в дозе 1000 нмоль/кг не оказали влияния на массу тела и потребление корма [40]. Анорексигенные эффекты обестатина не получили подтверждения и в ряде других работ [67, 68].

Секреция обестатина не зависит от калорийности диеты, а также от чувства голода или сытости [46]. Однако между показателями индекса массы тела, уровнем глюкозы в крови, уровнем инсулина и лептина, с одной стороны, и содержанием обестатина в крови – с другой, прослеживается значимая отрицательная корреляция, что дает основания предполагать роль обестатина в регуляции питания [69]. В среднем содержание обестатина в плазме крови у тучных людей на 64,19 пг/мл ниже, чем у людей с нормальным весом [70]. Снижение содержания обестатина связывают с ожирением не только у взрослых, но и у детей. Так, у детей, страдающих от ожирения, наблюдается пониженное содержание обестатина, а также прослеживается положительная корреляция между снижением концентрации пептида и потреблением жиров [71]. Существуют клинические данные, которые показывают, что уровень обестатина существенно увеличивается у пациентов с анорексией [69], а также булимией [57], хотя существуют данные, опровергающие связь между развитием булимии и изменением уровня обестатина [72].

#### 4.5. Возможные механизмы анорексигенных эффектов обестатина

Наблюдаемые анорексигенные эффекты обестатина подразумевают в первую очередь центральные механизмы действия; это в свою очередь предполагает, что данный пептид может проходить гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Однако однозначных данных, подтверждающих это, нет. Так, в исследованиях Пан и др. [73] показано, что обестатин с радиоактивной меткой активно проходит через капилляры ГЭБ в паренхимные клетки, причем с довольно высокой скоростью, большей, чем у многих известных пептидов, однако определить точный механизм прохождения обестатином ГЭБ – по какой конкретной транспортной системе он осуществляется – авторам не удалось, как и обнаружить его в ЦНС. Более того, было показано, что большая часть меченого обестатина уже через 10 мин после внутривенного введения разлагается на более мелкие пептидные фрагменты, что также не позволяет однозначно утверждать, может ли все-таки сам обестатин преодолевать ГЭБ [73]: одними исследователями это трактуется как неспособность обестатина преодолевать ГЭБ [74], а другими, наоборот, как способность преодолевать ГЭБ с достаточно высокой скоростью [75].

Определение механизмов и мишеней направленного действия обестатина затруднено также тем, что до сих пор не определены рецепторы, с которыми он взаимодействует и, соответственно, нет адекватных инструментов (агонистов или антагонистов) для дальнейшего изучения его функций. Исходно обестатин был открыт как лиганд сопряженного с G-белком рецептора 39 (GPR39), поскольку он содержит домен для его активации [76]. Эти данные получили подтверждение в экспериментах *in vitro* по активации данного типа рецептора обестатином в мышечных миоцитах линии C2C12 [77] и *in vivo* на овцах, у которых внутрижелудочковое введение обестатина увеличивает экспрессию мРНК GPR39 в медиобазальном гипоталамусе [78, 89]. В исследованиях Колодзейски и соавт. было показано, что при ожирении и диабете 2-го типа увеличение экспрессии мРНК GPR39 в печени и уменьшение в поджелудочной железе коррелирует с соответствующим уровнем экспрессии обестатина [37]. Эти данные позволяют предположить, что обестатин может реализовывать метаболические эффекты в ЦНС через данный рецептор. Однако в ряде исследований связывание обестатина с GPR39 было опровергнуто и показано его связывание с рецептором глюкагоноподобного пептида 1 (GLP-1R) [79, 80]. В исследованиях Гаргантини и др. показано, что обестатин конкурирует с агонистами GLP-1R в клетках-предшественниках гиппокампа [81]. Высокая экспрессия GLP-1R обнаружена в разных тканях, в том числе в ЦНС, где

он может действовать как фактор регулирования аппетита. Однако в исследованиях Униаппана и др. показано, что обестатин не связывается с GLP-1R и не замещает связывание GLP-1 с клетками INS-1 (клетки инсулиномы крысы) и клетками линии HEK293, активно экспрессирующими GLP-1R [40]. Эти данные, наоборот, свидетельствуют об отсутствии убедительных доказательств действия обестатина через GLP-1R. В 2017 г. Прадхан и его коллеги выдвинули гипотезу, согласно которой обестатин действует через рецептор гормона роста (GHS-R) в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, так как в областях с инактивированным GHS-R не наблюдается действие пептида [82]. Данными, противоречащими первоначальному предположению, что обестатин выступает в первую очередь как антагонист грелина, стали результаты исследования Сзакаса и др., в котором рассматривают совместное действие упомянутых соединений на механизмы сна, памяти и анальгезии. В результате было выдвинуто предположение, что обестатин способен действовать через рецептор грелина (GHRP6) [83], однако убедительных доказательств этому пока нет. Еще один возможный механизм действия обестатина связан с кортикотропин-релизинг-фактором, который также обладает анорексигенными свойствами, подавляя аппетит [84]. То есть, возможно, обестатин способен к активации рецепторов CRF1 и CRF2 [85].

Основные механизмы контроля потребления пищи включают в себя взаимодействие между головным мозгом, пищеварительной системой и жировой тканью. Данные о центральных эффектах обестатина очень фрагментарны и противоречивы, что вытекает из противоречивых данных о рецепторных механизмах и возможности преодоления ГЭБ. Так, в исследованиях Брунетти и соавт. было показано, что при прямом введении 1 нмоль/кг обестатина в аркуатное ядро гипоталамуса достоверно уменьшаются количество потребляемых калорий и прибавка веса [66]. Также было показано, что внутривенное введение обестатина индуцирует экспрессию *c-fos* в PVN, а иммунофлуоресцентное окрашивание показало также активацию нейронов PVN, содержащих CRF и уротектин-2 [85].

В ряде исследований было показано, что гипоталамический контроль пищевого поведения может проявляться в модуляции активности катехоламинергических нейронов ствола мозга (дофаминергических, норадренергических и серотонинергических). И афферентная, и эфферентная иннервация от гипоталамических структур, вовлеченных в гомеостатическую регуляцию энергетического баланса и пищевого поведения, распространяется главным образом через серотонинергические (5-HT<sub>1B</sub> и 5-HT<sub>2C</sub>-рецепторы), катехоламинергические ( $\alpha_1$ ,  $\beta_1$  и  $\beta_2$ -адрено-

рецепторы) и дофаминергические (D<sub>1</sub>-рецепторы) медиаторные системы [86, 87]. Так, широко известные гормоны-аноректики лептин, амилин и PYY ингибируют высвобождение дофамина из гипоталамических синапсов крыс [88–90]; это позволяет предполагать, что именно дофамин может играть ключевую роль в ЦНС в регуляции пищевого поведения, причем как стимулирующую, так и ингибирующую. Исследования Брунетти показали, что введение обестатина также ингибирует вызванное деполяризацией высвобождение дофамина и, по мнению исследователей, может быть одним из центральных механизмов действия обестатина; также было показано, что обестатин блокирует грелин-зависимое ингибирование секреции серотонина в клетках гипоталамуса [66].

Анорексигенные эффекты обестатина могут быть связаны не только и не столько с потреблением пищи, сколько со снижением потребления жидкости [91], причем на фоне снижения секреции вазопрессина – важнейшего регулятора водно-солевого баланса. Такие эффекты обестатина позволяют, по мнению ряда исследователей, считать его эндогенным регулятором уровня жидкости в организме [92]. Снижение потребления воды может приводить к интенсификации процессов липолиза (с целью поддержания водно-солевого баланса), приводя также к снижению потребления пищи. Вместе эти эффекты могут приводить к достаточно интенсивному снижению массы тела. Показано также, что обестатин может участвовать в регуляции липидного обмена путем ингибирования липолиза в адипоцитах [80], а хроническое введение стабилизированного обестатина значительно снижает уровень триглицеридов в плазме: это свидетельствует о возможной роли обестатина в липидном гомеостазе [93].

Регуляцию многих функций организма – и пищевого поведения, в частности – все чаще рассматривают в контексте системы «ЖКТ-мозг», которая является сложной нейрогуморальной коммуникационной сетью, поддерживающей метаболический гомеостаз [94]. И потому ЖКТ является не менее важной мишенью обестатина в регуляции пищевого поведения, чем мозг. В исследованиях Жанг и др. было показано, что обестатин снижает перистальтическую активность антрального отдела желудка и двенадцатиперстной кишки у взрослых крыс, причем преимущественно в состоянии сытости, препятствуя впоследствии возвращению исходного уровня перистальтики [19, 95], тем самым способствуя снижению потребления пищи. Исследования Слупека и др. также подтвердили подавление моторики двенадцатиперстной и тощей кишки у взрослых крыс на фоне введения обестатина, однако в раннем возрасте (до периода половозрелости крыс) эти авторы наблюдали противополож-

ные эффекты: улучшение перистальтики ЖКТ [47]. Но, как и в случае с центральными механизмами, влияние обестатина на работу ЖКТ также оспаривается рядом исследователей [96, 97]. Противоречивы и данные о влиянии обестатина на секрецию инсулина и, соответственно, на уровень глюкозы в крови, что также может быть одним из механизмов регуляции потребления пищи. В экспериментах *in vitro* было показано, что обестатин увеличивает секрецию С-пептида [98], который в клинике является маркером синтеза инсулина. Однако во многих экспериментах *in vivo* не было выявлено влияния обестатина на уровень глюкозы или инсулина в крови нормогликемических мышей и крыс [79, 91]; при этом было показано, что индуцированная глюкозой секреция инсулина у крыс и в изолированных островках Лангерганса мышей и крыс ингибируется обестатином [99]; это согласуется с клиническими данными об отрицательной корреляции между уровнями обестатина и инсулина [100]. Ключевым связующим звеном системы «ЖКТ-мозг» можно рассматривать блуждающий нерв – главный нерв парасимпатической нервной системы, регулирующий активность большей части органов пищеварительного тракта, содержащий около 80% афферентных волокон и 20% эфферентных. Есть предположение, что изменение чувствительности блуждающего нерва может быть одной из причин нарушения регуляции аппетита, что увеличивает риск развития ожирения [10]. В исследованиях Майер и соавт. было показано, что и у людей с нормальным весом, и у страдающих ожирением атропин (блокатор М-холинорецепторов), а также прием пищи вызывают значительное снижение уровня обестатина и грелина в крови, однако соотношение концентраций грелина/обестатина значительно снижалось только у худых индивидов. Кроме того, была обнаружена достоверно более сильная корреляция между концентрациями грелина и обестатина в плазме у тучных, чем у худых людей, что предполагает нарушение независимой регуляции этими пептидами потребления пищи при развитии ожирения. Блокада афферентной части блуждающего нерва капсаицином устраняет ингибирующее действие обестатина на подвижность двенадцатиперстной кишки, но не антрального отдела желудка [85]. Участие афферентных путей блуждающего нерва было подтверждено увеличением *c-fos*-позитивных нейронов в ядре одиночного тракта продолговатого мозга при внутривенной инъекции обестатина. Вместе эти результаты показывают, что часть эффектов обестатина можно рассматривать как реализующиеся через модуляцию активности блуждающего нерва, однако не все [101].

В ряде исследований, посвященных пептидам-регуляторам аппетита, показано, что возможным общим центральным модулятором их активности в гипоталамусе является NO: на фоне

пептидов, улучшающих аппетит, наблюдают увеличение уровня NO, тогда как пептиды, уменьшающие потребление пищи, снижают его уровень [102]. Обестатин, в свою очередь, способен изменять содержание NO [103]; правда, большинство работ, посвященных взаимосвязи между уровнями обестатина и NO, исследуют их взаимоотношения на уровне потенциальных кардиопротекторных свойств обестатина, а не в контексте регуляции аппетита [104].

На рис. 2 представлена обобщающая схема возможных механизмов анорексигенных эффектов обестатина.

### 5. Фрагменты обестатина – потенциальные регуляторы пищевого поведения и массы тела

Затруднения в изучении обестатина не в последнюю очередь связаны с его относительно низкой стабильностью. Возможно, за реализацию разных его функций отвечают различные фрагменты, на которые он распадается под действием протеаз. Изучение эффектов фрагментов обестатина представляет особый интерес: как фрагментные структуры большого белка, они могут обладать частью спектра действий целого пептида, однако при этом они также могут иметь отличные от него свойства. В связи с неоднозначностью данных по действию самого обестатина, действие его фрагментов остается крайне малоизученным.

Исследования эффектов фрагмента обестатина ведутся, как правило, в двух направлениях. Во-первых, это поиск той составной части молекулы обестатина, которая непосредственно играет роль в реализации воздействия на массу тела, потребление пищи и воды. Во-вторых, исследование эффектов модификаций фрагментов, имеющих более стабильную структуру и, как результат, более пролонгированное действие.

В ряде ранних работ по исследованию обестатина был показан довольно короткий период его деградации в тканях [25, 39, 73]. Однако уже в работе Вергота и др. было уточнено, что метаболическая деградация обестатина в гомогенатах печени, почек и плазмы имеет различный период полураспада в диапазоне от 12,6 до 138,0 мин. Кроме того, эти исследования показали, что протеолитический гидролиз обестатина в разных тканях идет по-разному. Так, например: гидролиз человеческого обестатина в мышинной плазме идет между F<sup>1</sup>–N<sup>2</sup> с вероятностью 95%, в гомогенате печени между P<sup>4</sup>–F<sup>5</sup> – с вероятностью 41%, между Y<sup>16</sup>–Q<sup>17</sup> – с вероятностью 34%, между Q<sup>17</sup>–H<sup>18</sup> – с вероятностью 10%; в гомогенате почек между F<sup>1</sup>–N<sup>2</sup> – с вероятностью 13%, между S<sup>12</sup>–G<sup>13</sup> – с вероятностью 49%, между G<sup>13</sup>–V<sup>14</sup> – с вероятностью 16%. Гидролиз мышинового обестатина в плазме чаще шел между F<sup>1</sup>–N<sup>2</sup> (84%), а в печени – между P<sup>4</sup>–F<sup>5</sup> (75%) [105].

Некоторые исследователи объясняют наличие пролонгированного эффекта от введения целого пептида отчасти его относительно устойчивой к протеолизу структуре [105], а отчасти тем, что образующиеся под влиянием эндопептидаз фрагменты вызывают эффект, схожий с эффектом целого пептида [106]. Так, в одной из работ было показано, что N-концевой фрагмент обестатина FNAP, стабильность которого была увеличена за счет амидирования, имеет более выраженное влияние на массу тела, потребление корма и воды, чем целый пептид [106].

В литературе существуют довольно противоречивые данные об эффектах фрагментов обестатина, которые оказывают влияние на пищевое поведение. Так, например, в работе Нагарадж и др. по изучению действия хронического введения фрагментов обестатина 1–13, 6–18 и 11–23 было показано, что наибольшим анорексигенным эффектом обладает фрагмент 1–13 [65]. Однако Сабасинхажа и соавт. считают, что наибольшую эффективность имеет фрагмент 11–23, анорексигенный эффект которого сопоставим с эффектом самого обестатина. По мнению ряда исследователей влияние этого фрагмента на «систему аппетита» не имеет прямой связи с влиянием на гомеостаз глюкозы и инсулина [32], однако

другие исследователи придерживаются противоположной точки зрения [107]. По данным Сабасинхажа, фрагмент 1–10 не оказывает выраженного влияния на массу тела и потребление пищи.

В работе Хиразовой и др. было показано, что однократное введение концевых 1–4 и 16–23 фрагментов обестатина вызывает значимое снижение массы тела крыс, уменьшение потребления корма и воды, тогда как фрагменты 5–10 и 10–15, наоборот, способствуют увеличению потребления воды и пищи [106]. Возможно, что центральные фрагменты обестатина обладают иными по сравнению с целым пептидом свойствами (либо не влияют на потребление пищи, либо могут его усиливать), а концевые фрагменты оказывают, как и целый пептид, анорексигенное действие. Интересно отметить, что дополнительное исследование хронического введения концевых 1–4 и 16–23 фрагментов обестатина выявило сохранение анорексигенных эффектов только для N-концевой части пептида [106].

В работе Моторыкиной и др. анорексигенные эффекты для концевой части обестатина 1–4 были показаны не только для самцов, но и для самок. При этом эффекты от введения этого пептида регистрировали в отставленном периоде. Авторы связывают такую задержку в проявлении

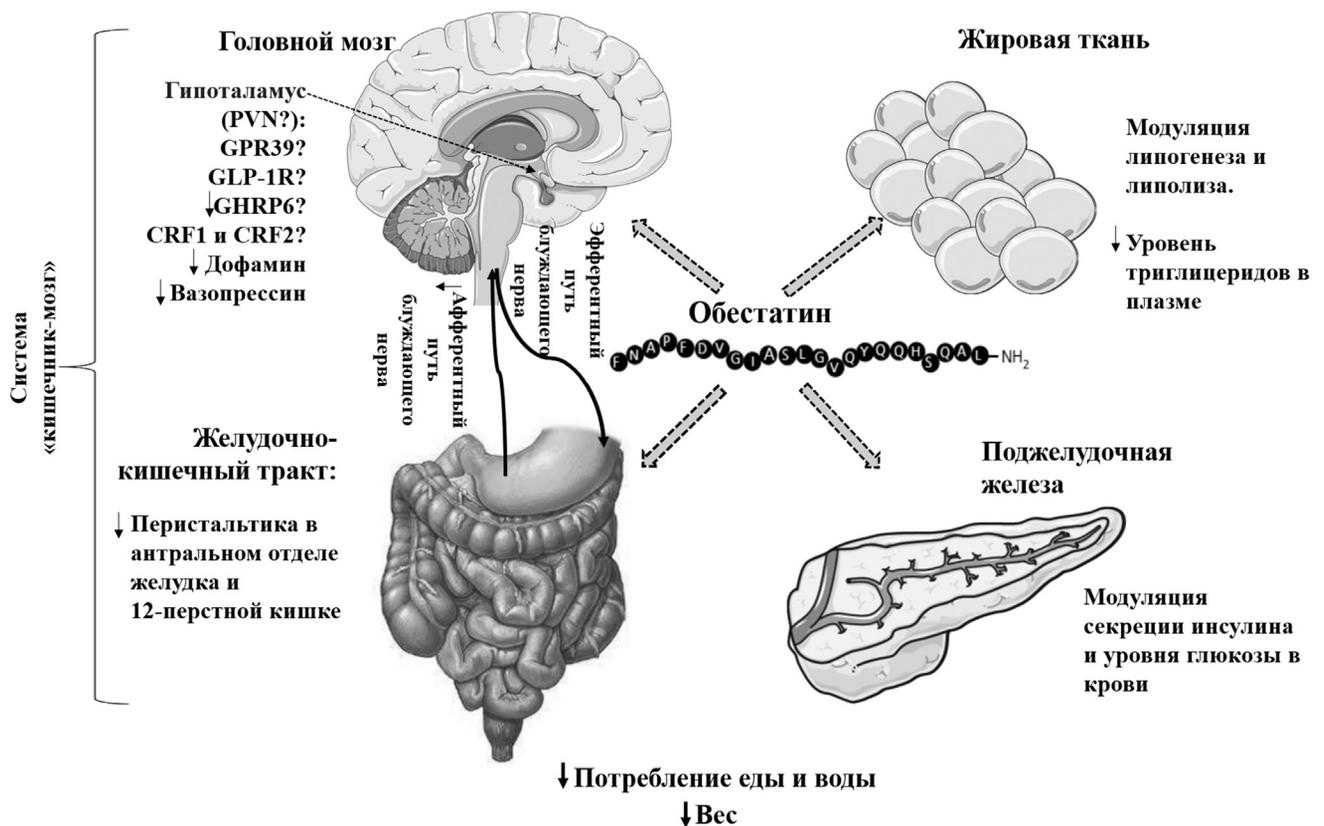


Рис. 2. Возможные механизмы анорексигенных эффектов обестатина

Условные обозначение: PVN – паравентрикулярное ядро гипоталамуса; GPR39 – сопряженный с G-белком рецептор 39; GLP-1R – рецептор глюкагоноподобного пептида 1; GHRP6 – рецептор грелина; CRF1 и CRF2 – рецепторы кортикотропин-рилизинг-фактора; ? – предположение о локализации рецепторов, которые могут участвовать в реализации эффектов; ↓ – направленность изменений в сторону снижения.

эффекта с запуском каскадных реакций и действием на организм вторичных посредников [108]. Такой характер действия является общим свойством регуляторных пептидов и может служить не только для обеспечения быстрого прямого ответа, но и для относительно длительных регуляторных влияний.

В работе Хиразовой и др. для фрагмента обестатина 1–4 в модели крыс с повышенной массой было также показано снижение потребления корма и воды, без изменения массы тела. Отсутствие изменений массы тела после введения пептида авторы объясняют недостаточно продолжительным временем мониторинга данного показателя и предполагают проявление эффекта в более позднем периоде [106]. Исследование дозозависимости проявления анорексигенного эффекта 1–4 фрагмента обестатина показало его эффективность в более низких дозах 100 и 300 нмоль/кг [108].

Обобщающие данные о влиянии фрагментов обестатина на массу тела, потребление корма и воды представлены в табл. 3.

Как было сказано ранее, анорексигенные эффекты обестатина могут быть связаны с уменьшением потребления воды [92]. Однако в исследованиях Моторыкиной и др. этого не было показано: ни обестатин, ни его фрагмент 1–4 на фоне депривации при однократном и хроническом введении не вызывают изменений показателей питьевой мотивации [108]. В связи с этим можно предположить, что анорексигенное действие обестатина и его фрагмента напрямую не связано

с изменением питьевой мотивации, а реализуется за счет других механизмов, которые впоследствии приводят к изменению потребления жидкости.

### Заключение

За 15 лет с момента открытия обестатина в 2005 г. было неоднократно показано, что этот пептид участвует в регуляции не только пищевого поведения и системы аппетита, но и многих других физиологических процессов в организме. При этом обестатин все еще остается «неоднозначным пептидом», в первую очередь из-за противоречивых данных о центральных эффектах и неопределенности рецепторных механизмов. Рецепторы GPR39, GLP-1R, CRF1 и CRF2 рассматриваются разными исследователями в качестве потенциальных для обестатина и его фрагментов. Однако до настоящего времени отсутствуют убедительные доказательства того, что эффекты обестатина или его фрагментов обусловлены активацией определенного типа рецепторов. Это дает повод некоторым исследователям подвергать сомнениям саму постановку вопроса, можно ли обестатин считать гормоном. Однако доказанная секреция обестатина в различных типах клеток, а также его аутокринное/паракринное действие в разных тканях позволяют, даже при отсутствии явно доказанного рецепторного механизма, считать обестатин гормоном. Более того, обестатин обладает плеiotропными свойствами даже в регуляции пищевого поведения: подавляет моторику ЖКТ, регулирует секрецию инсулина, уменьшает воспаление, инги-

Таблица 3

Влияние фрагментов обестатина на массу тела, потребление корма и воды

Фрагменты обестатина	Способ введения	Доза	Объект	Влияние на			Ссылка
				масса	корм	вода	
1–4	Однократно и/н	300 нмоль/кг	крысы	↓	↓	↓	[106]
	Хронически и/н			↓	↓	↓	
	Хронически и/н	300 нмоль/к	крысы с ожирением	=	↓	↓	[106]
	Однократно и/н	100 нмоль/кг	крысы	↓	=	↓	[91]
		300 нмоль/кг		↓	=	↓	
1000 нмоль/кг	=	=		=			
Однократно и/н	300 нмоль/кг	крысы	↓	↓	↓	[108]	
1–10	Хронически в/б	1 моль/кг	мышы с ожирением	--	=	--	[107]
1–13	Хронически в/б	80 нмоль/кг	мышы	=	=	=	[65]
6–18				=	=	=	
5–10				=	↑	↑	
10–15	Однократно и/н	300 нмоль/кг	крысы	=	=	↑	[106]
11–23	Однократнов/б	1 мкмоль/кг	мышы	--	↓	--	[32]
	Однократно и/н	300 нмоль/кг	крысы	=	=	=	[106]
	Хронически в/б	1 моль/кг	мышы с ожирением	--	↓	--	[107]
		80 нмоль/кг	мышы	=	=	=	[65]
16–23	Однократно и/н	300 нмоль/кг	крысы	↓	↓	↓	[106]
	Хронически и/н			↑	=	=	

Условные обозначения: ↓ – значимое снижение показателя,  $p < 0,05$ ; ↑ – значимое увеличение показателя,  $p < 0,05$ ; = – отсутствие изменений; -- – измерения не проводились.

бирует апоптоз, стимулирует клеточную пролиферацию. Это позволяет предполагать, что обестатин может предотвращать возникновение и развитие некоторых заболеваний ЖКТ. При этом его многочисленные биологические функции и терапевтический потенциал представляют большой интерес и важность для дальнейших исследований,

в том числе – в плане поиска наиболее эффективных и устойчивых фрагментов обестатина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекта № 19-115-50398). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Talley N.J.* Dyspepsia: management guidelines for the millennium // *Gut*. 2002. Vol. 50. Suppl. 4. P. iv72–iv78.
2. *Hudson J.I., Hiripi E., Pope Jr H.G., Kessler R.* The prevalence and correlates of eating disorders in the National Comorbidity Survey Replication // *Biol. Psychiatry*. 2007. Vol. 61. N 3. P. 348–358.
3. *American Dietetic Association.* Position of the American Dietetic Association: nutrition intervention in the treatment of anorexia nervosa, bulimia nervosa, and eating disorders not otherwise specified (EDNOS) // *J. Am. Diet. Assoc.* 2001. Vol. 101. N 7. P. 810–819.
4. *Millar H.R., Wardell F., Vyvyan J.P., Naji S.A., Prescott G.J., Eagles J.M.* Anorexia nervosa mortality in Northeast Scotland, 1965–1999 // *Am. J. Psychiatry*. 2005. Vol. 162. N 4. P. 753–757.
5. World Health Organisation Website [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.who.int/about> (дата обращения 13.03.2020).
6. *James W.P.T., Jackson-Leach R., Mhurchu C.N., Kalamara E., Shayeghi M., Rigby N., Nishida C.R.A., Rodgers A.* Overweight and obesity (high body mass index). Chapter 8 // *Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors*. Switzerland: World Health Organization, 2004. 2248 pp.
7. *Jungheim E.S., Travieso J.L., Carson K.R., Moley K.H.* Obesity and reproductive function // *Obstet. Gynecol. Clin.* 2012. Vol. 39. N 4. P. 479–493.
8. *Jiao L., De Gonzalez A.B., Hartge P., et al.* Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts // *Cancer Causes Control*. 2010. Vol. 21. N 8. P. 1305–1314.
9. World Health Organisation Website [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://www.who.int/features/factfiles/obesity/ru/> (дата обращения 13.03.2020).
10. *Willer C.J., Speliotes E.K., Loos R.J.F., et al.* Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation // *Nat. Genet.* 2009. Vol. 41. N 1. P. 25–34.
11. *Zheng H., Lenard N.R., Shin A.C., Berthoud H.R.* Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals // *Int. J. Obes.* 2009. Vol. 33. Suppl. 2. P. S8–S13.
12. *Speliotes E.K., Willer C.J., Berndt S.I., et al.* Association analyses of 249,796 individuals reveal 18 new loci associated with body mass index // *Nat. Genet.* 2010. Vol. 42. N 11. P. 937–948.
13. *Gairolla J., Kler R., Modi M., Khurana D.* Leptin and adiponectin: Pathophysiological role and possible therapeutic target of inflammation in ischemic stroke // *Rev. Neurosci.* 2017. Vol. 28. N 3. P. 295–306.
14. *Smirnova O.V.* The physiology of the endocrine system. Cambridge: Cambridge Scholars Publishing, 2019. 239 pp.
15. *Bartness T.J., Keen-Rhinehart E., Dailey M.J., Teubner B.J.* Neural and hormonal control of food hoarding // *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 2011. Vol. 301. N 3. P. 641–655.
16. *Pimentel G.D., Micheletti T.O., Pace F., Rosa J.C., Santos R.V.T., Lira F.S.* Gut-central nervous system axis is a target for nutritional therapies // *Nutr. J.* 2012. Vol. 11. N 1. P. 22.
17. *Shintani M., Ogawa Y., Ebihara K., Aizawa-Abe M., Miyanaga F., Takaya K., Hayashi T., Inoue G., Hosoda K., Kojima M., Kangawa K., Nakao K.* Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway // *Diabetes*. 2001. Vol. 50. N 2. P. 227–232.
18. *Green B.D., Grieve D.J.* Biochemical properties and biological actions of obestatin and its relevance in type 2 diabetes // *Peptides*. 2018. Vol. 100. P. 249–259.
19. *Zhang J.V., Ren P.G., Avsian-Kretschmer O., Luo C.-W., Rauch R., Klein C., Hsueh A.J.W.* Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake // *Science*. 2005. Vol. 310. N 5750. P. 996–999.
20. *Scrima M., Campiglia P., Esposito C., Gomez-Monterrey I., Novellino E., D'Ursi A.M.* Obestatin conformational features: A strategy to unveil obestatin's biological role? // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 363. N 3. P. 500–505.
21. *Grönberg M., Tsolakis A.V., Magnusson L., Janson E.T., Saras J.* Distribution of obestatin and ghrelin in human tissues: immunoreactive cells in the gastrointestinal tract, pancreas, and mammary glands // *J. Histochem. Cytochem.* 2008. Vol. 56. N 9. P. 793–801.
22. *Grönberg M., Amini R.M., Stridsberg M., Janson E.T., Saras J.* Neuroendocrine markers are expressed in human mammary glands // *Regul. Pept.* 2010. Vol. 160. N 1–3. P. 68–74.
23. *Gurriarán-Rodríguez U., Santos-Zas I., Al-Massadi O., Mosteiro C.S., Beiroa D., Nogueiras R., Crujeiras A.B., Seoane L.M., Señaris J., García-Caballero T., Gallego R., Casanueva F.F., Pazos Y., Camiña J.P.* The obestatin/GPR39 system is up-regulated by muscle injury and functions as an autocrine regenerative system // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 45. P. 38379–38389.
24. *Moretti E., Vindigni C., Tripodi S.A., Mazzi L., Nuti R., Figura N., Collodel G.* Immunolocalisation of ghrelin and obestatin in human testis, seminal vesicles, prostate and spermatozoa // *Andrologia*. 2014. Vol. 46. N 9. P. 979–985.
25. *Zhao C.-M., Furnes M. W., Stenström B., Kulseng B., Chen D.* Characterization of obestatin- and ghrelin-producing cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rats: an immunohistochemical and electron-microscopic study // *Cell Tissue Res*. 2008. Vol. 331. N 3. P. 575–587.

26. Aydin S., Ozkan Y., Erman F., Gurates B., Kilic N., Colak R., Gundogan T., Catak Z., Bozkurt M., Akin O., Sen Y., Sahn I. Presence of obestatin in breast milk: relationship among obestatin, ghrelin, and leptin in lactating women // *Nutrition*. 2008. Vol. 24. N 7–8. P. 689–693.
27. Cengiz H., Dagdeviren H., Caypinar S.S., Kanawati A., Yildiz S., Ekin M. Plasma serotonin levels are elevated in pregnant women with hyperemesis gravidarum // *Arch. Gynecol. Obstet.* 2015. Vol. 291. N 6. P. 1271–1276.
28. Dag E., Aydin S., Ozkan Y., Erman F., Dagli A.F., Gurger M. Alteration in chromogranin A, obestatin and total ghrelin levels of saliva and serum in epilepsy cases // *Peptides*. 2010. Vol. 31. N 5. P. 932–937.
29. Xing Y.X., Yang L., Kuang H.Y., Gao X.Y., Liu H.L. Function of obestatin in the digestive system // *Nutrition*. 2017. Vol. 34. P. 21–28.
30. Tsolakis A.V., Grimelius L., Stridsberg M., Falkmer S.E., Waldum H.L., Saras J., Janson E.T. Obestatin/ghrelin cells in normal mucosa and endocrine tumours of the stomach // *Eur. J. Endocrinol.* 2009. Vol. 160. N 6. P. 941–949.
31. Dun S.L., Brailoiu G.C., Brailoiu E., Yang J., Chang J.K., Dun N.J. Distribution and biological activity of obestatin in the rat // *J. Endocrinol.* 2006. Vol. 191. N 2. P. 481–490.
32. Green B.D., Irwin N., Flatt P.R. Direct and indirect effects of obestatin peptides on food intake and the regulation of glucose homeostasis and insulin secretion in mice // *Peptides*. 2007. Vol. 28. N 5. P. 981–987.
33. Zhang J.V., Jahr H., Luo C.W., Klein C., Van Kolen K., Ver Donck L., De A., Baart E., Li J., Moechars D., Hsueh A.J. Obestatin induction of early-response gene expression in gastrointestinal and adipose tissues and the mediatory role of G protein-coupled receptor, GPR39 // *Mol. Endocrinol.* 2008. Vol. 22. N 6. P. 1464–1475.
34. Brunetti L., Leone S., Orlando G., Recinella L., Ferrante C., Chiavaroli A., Di Nisio C., Di Michele P., Vacca M. Effects of obestatin on feeding and body weight after standard or cafeteria diet in the rat // *Peptides*. 2009. Vol. 30. N 7. P. 1323–1327.
35. Hassouna R., Zizzari P., Viltart O., Yang S.K., Gardette R., Videau C., Badoer E., Epelbaum J., Tolle V. A natural variant of obestatin, Q90L, inhibits ghrelin's action on food intake and GH secretion and targets NPY and GHRH neurons in mice // *PLoS One*. 2012. Vol. 7. N 12: e51135.
36. Jung J.Y., Jeong J.B., Kim J.W., Kim S.H., Koh S.-J., Kim B.G., Lee K.L. Circulating ghrelin levels and obestatin/ghrelin ratio as a marker of activity in ulcerative colitis // *Intest. Res.* 2015. Vol. 13. N 1. P. 68–73.
37. Kolodziejewski P.A., Pruszyńska-Oszmalek E., Sassek M., Kaczmarek P., Szczepankiewicz D., Billert M., Mackowiak P., Strowski M.Z., Nowak K.W. Changes in obestatin gene and GPR39 receptor expression in peripheral tissues of rat models of obesity, type 1 and type 2 diabetes // *J. Diabetes*. 2017. Vol. 9. N 4. P. 353–361.
38. Seoane L.M., Al-Massadi O., Pazos Y., Pagotto U., Casanueva F.F. Central obestatin administration does not modify either spontaneous or ghrelin-induced food intake in rats // *J. Endocrinol. Invest.* 2006. Vol. 29. N 8. P. RC13–RC15.
39. Zizzari P., Longchamps R., Epelbaum J., Bluet-Pajot M.T. Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents // *Endocrinology*. 2007. Vol. 148. N 4. P. 1648–1653.
40. Unniappan S., Speck M., Kieffer T.J. Metabolic effects of chronic obestatin infusion in rats // *Peptides*. 2008. Vol. 29. N 8. P. 1354–1361.
41. Gao X.Y., Kuang H.Y., Liu X.M., Bin Z. Decreased gastric body mucosa obestatin expression in abdominal obesity patients with normal body mass index // *Biomed. Environ. Sci.* 2014. Vol. 27. N 5. P. 385–387.
42. Seim I., Walpole C., Amorim L., Josh P., Herington A., Chopin L. The expanding roles of the ghrelin-gene derived peptide obestatin in health and disease // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011. Vol. 340. N 1. P. 111–117.
43. Mondal M.S., Toshinai K., Ueno H., Koshinaka K., Nakazato M. Characterization of obestatin in rat and human stomach and plasma, and its lack of acute effect on feeding behavior in rodents // *J. Endocrinol.* 2008. Vol. 198. N 2. P. 339–346.
44. Reinehr T., De Sousa G., Roth C.L. Obestatin and ghrelin levels in obese children and adolescents before and after reduction of overweight // *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*. 2008. Vol. 68. N 2. P. 304–310.
45. Ulasoglu C., Isbilen B., Doganay L., Ozen F., Kiziltas S., Tuncer I. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on serum ghrelin and obestatin levels // *World J. Gastroenterol. WJG*. 2013. Vol. 19. N 15. P. 2388–2394.
46. Huda M.S.B., Durham B.H., Wong S.P., Deepak D., Kerrigan D., McCulloch P., Ranganath L., Pinkney J., Wilding J.P.H. Plasma obestatin levels are lower in obese and post-gastrectomy subjects, but do not change in response to a meal // *Int. J. Obes.* 2008. Vol. 32. N 1. P. 129–135.
47. Stupecka M., Pierzynowski S.G., Kuwahara A., Kato I., Woliński J. Age-dependent effect of obestatin on intestinal contractility in Wistar rats // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014. Vol. 208. P. 109–115.
48. Squecco R., Garella R., Francini F., Baccari M.C. Influence of obestatin on the gastric longitudinal smooth muscle from mice: mechanical and electrophysiological studies // *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2013. Vol. 305. N 9. P. G628–G637.
49. Stupecka-Ziemilska M., Grzesiak P., Jank M., Majewska A., Rak A., Kowalczyk P., Kato I., Kuwahara A., Woliński J. Small intestinal development in suckling rats after enteral obestatin administration // *PLoS One*. 2018. Vol. 13. N 10: e51223.
50. Taskin E., Atli B., Kiliç M., Sari Y., Aydin S. Serum, urine, and saliva levels of ghrelin and obestatin pre- and post-treatment in pediatric epilepsy // *Pediatr. Neurol.* 2014. Vol. 51. N 3. P. 365–369.
51. Schubert M.L. Gastric secretion // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2014. Vol. 30. N 6. P. 578–582.
52. Granata R., Volante M., Settanni F., Gauna C., Ghé C., Annunziata M., Deidda B., Gesmundo I., Abribat T., van der Lely A.J., Muccioli G., Ghigo E., Papotti M. Unacylated ghrelin and obestatin increase islet cell mass and prevent diabetes in streptozotocin-treated newborn rats // *J. Mol. Endocrinol.* 2010. Vol. 45. N 1. P. 9–17.
53. Baragli A., Grande C., Iacopo G., Settanni F., Marina T., Gargantini E., Ghigo E., Granata R. Obestatin enhances *in vitro* generation of pancreatic islets through regulation of developmental pathways // *PLoS One*. 2013. Vol. 8. N 5: e64374.
54. Li W., Chang M., Qiu M., Chen Y., Zhang X., Li Q., Cui C. Exogenous obestatin decreases beta-cell apoptosis and alpha-cell proliferation in high fat diet and streptozotocin induced type 2 diabetic rats // *Eur. J. Pharmacol.* 2019. Vol. 851. P. 36–42.

55. *El-Asfar R.K., Kamal M.M., EL-Razek R.S.A., Ebtehal E.D., El-Mesallamy H.O.* Obestatin can potentially differentiate Wharton's jelly mesenchymal stem cells into insulin-producing cells // *Cell Tissue Res.* 2018. Vol. 372. N 1. P. 91–98.
56. *Gao X.Y., Kuang H.Y., Liu X.M., Ma Z.B.* Decreased gastric body mucosa obestatin expression in overweight and obese patients // *Peptides.* 2010. Vol. 31. N 2. P. 291–296.
57. *Sedlackova D., Kopeckova J., Papezova, H., Hainer V., Kvasnickova H., Hill M., Nedvidkova J.* Comparison of a high-carbohydrate and high-protein breakfast effect on plasma ghrelin, obestatin, NPY and PYY levels in women with anorexia and bulimia nervosa // *Nutr. Metab.* 2012. Vol. 9. N 1: 52.
58. *Büscher A.K., Cetiner M., Büscher R., Wingen A.M., Hauffa B.P., Hoyer P.F.* Obesity in patients with Bardet-Biedl syndrome: influence of appetite-regulating hormones // *Pediatr. Nephrol.* 2012. Vol. 27. N 11. P. 2065–2071.
59. *Gutierrez-Grobo Y., Villalobos-Blasquez I., Sánchez-Lara K., Villa A.R., Ponciano-Rodríguez G., Ramos M. H., Chavez-Tapia N.C., Uribe M., Méndez-Sánchez N.* High ghrelin and obestatin levels and low risk of developing fatty liver // *Ann. Hepatol.* 2010. Vol. 9. N 1. P. 52–57.
60. *Dembiński A., Warzecha Z., Ceranowicz P., Cieszkowski J., Dembiński M., Ptak-Belowska A., Kuwahara A., Kato I.* Administration of obestatin accelerates the healing of chronic gastric ulcers in rats // *Med. Sci. Monit.* 2011. Vol. 17. N 8. P. BR196–BR200.
61. *Korkut S., Özdemir A., Yay A.H., Yalçın B., Ceylan M., Korkmaz L., Yazıcı C., Güntürk I., Kurtoğlu S.* Obestatin Reduces Intestinal Damage in Experimental Necrotizing Enterocolitis in Newborn Rats // *Am. J. Perinatol.* 2019. Vol. 36. N 11. P. 1179–1187.
62. *Matuszyk A., Ceranowicz P., Warzecha Z., Cieszkowski J., Gałazka K., Bonior J., Jaworek J., Konturek P.C., Gil K., Dembiński A.* Pretreatment with obestatin inhibits the development of acetic acid-induced colitis in rats // *Arch. Med. Sci.* 2018. Vol. 14. N 4. P. 920–929.
63. *Khaleel E.F., Abdel-Aleem G.A.* Obestatin protects and reverses nonalcoholic fatty liver disease and its associated insulin resistance in rats via inhibition of food intake, enhancing hepatic adiponectin signaling, and blocking ghrelin acylation // *Arch. Physiol. Biochem.* 2019. Vol. 125. N 1. P. 64–78.
64. *Kanat B.H., Ayten R., Aydn S., Girgin M., Çetinkaya Z., İlhan Y.S., Yur M., Çatak Z.* Significance of appetite hormone ghrelin and obestatin levels in the assessment of the severity of acute pancreatitis // *Turk. J. Gastroenterol.* 2014. Vol. 25. N 3. P. 309–313.
65. *Nagaraj S., Peddha M.S., Manjappara U. V.* Fragments of obestatin as modulators of feed intake, circulating lipids, and stored fat // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 366. N 3. P. 731–737.
66. *Brunetti L., Michelotto B., Orlando G., Vacca M.* Obestatin inhibits dopamine release in rat hypothalamus // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. Vol. 641. N 2–3. P. 142–147.
67. *Nogueiras R., Pfluger P., Tovar S., et al.* Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents // *Endocrinology.* 2007. Vol. 148. N 1. P. 21–26.
68. *Gourcerol G., Tache Y.* Obestatin—a ghrelin-associated peptide that does not hold its promise to suppress food intake and motility // *Neurogastroenterol. Motil.* 2007. Vol. 19. N 3. P. 161–165.
69. *Shen C., Yu T., Tang, Z.H., Wu K.M.* Changes in ghrelin and obestatin levels before and after a meal in children with simple obesity and anorexia // *Horm. Res. Paediatr.* 2013. Vol. 79. N 6. P. 341–346.
70. *Zhang N., Yuan C., Li Z., Li J., Li X., Li C., Li R., Wang S.R.* Meta-analysis of the relationship between obestatin and ghrelin levels and the ghrelin/obestatin ratio with respect to obesity // *Am. J. Med. Sci.* 2011. Vol. 341. N 1. P. 48–55.
71. *Aly G.S., Hassan N.E., Anwar G.M., Ahmed H.H., El-Masry S.A., El-Banna R.A., Ahmed N.H., Kamal A.N., Tarkan R.S.* Ghrelin, obestatin and the ghrelin/obestatin ratio as potential mediators for food intake among obese children: a case control study // *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 2020. Vol. 33. N 2. P. 199–204.
72. *Monteleone P., Serritella C., Martiadis V., Scognamiglio P., Maj M.* Plasma obestatin, ghrelin, and ghrelin/obestatin ratio are increased in underweight patients with anorexia nervosa but not in symptomatic patients with bulimia nervosa // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. Vol. 93. N 11. P. 4418–4421
73. *Pan W., Tu H., Kastin A.J.* Differential BBB interactions of three ingestive peptides: obestatin, ghrelin, and adiponectin // *Peptides.* 2006. Vol. 27. N 4. P. 911–916.
74. *Sobrino Crespo C., Perianes Cachero A., Puebla Jiménez L., Barrios V., Arilla Ferreira E.* Peptides and food intake // *Front. Endocrinol.* 2014. Vol. 5: 58.
75. *Szlis M., Wojcik-Gladysz A.* Neuromodulatory action of obestatin on the secretory activity of the hypothalamic-pituitary axis // *Zesz. Nauk. Uniw. Szczeciński. Acta Biol.* 2014. Vol. 21. P. 125–134.
76. *Alén B.O., Nieto L., Gurriarán-Rodríguez U., Mosteiro C.S., Álvarez-Pérez J.C., Otero-Alén M., Camiña J.P., Gallego R., García-Caballero T., Martín-Pastor M.* The NMR structure of human obestatin in membrane-like environments: insights into the structure-bioactivity relationship of obestatin // *PLoS One.* 2012. Vol. 7. N 10: e45434.
77. *Gurriarán-Rodríguez U., Santos-Zas I., González-Sánchez J., et al.* Action of obestatin in skeletal muscle repair: stem cell expansion, muscle growth, and microenvironment remodeling // *Mol. Ther.* 2015. Vol. 23. N 6. P. 1003–1021.
78. *Szlis M., Polkowska J., Skrzeczyńska E., Przybył B.J., Wojcik-Gladysz A.* Does obestatin modulate the hypothalamic appetite-regulating network in peripubertal sheep? // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2018. Vol. 102. N 3. P. 690–700.
79. *Granata R., Settanni F., Gallo D., Trovato L., Biancone L., Cantaluppi V., Nano R., Annunziata M., Campiglia P., Arnoletti E., Ghè C., Volante M., Papotti M., Muccioli G., Ghigo E.* Obestatin promotes survival of pancreatic  $\beta$ -cells and human islets and induces expression of genes involved in the regulation of  $\beta$ -cell mass and function // *Diabetes.* 2008. Vol. 57. N 4. P. 967–979.
80. *Granata R., Gallo D., Luque R.M., et al.* Obestatin regulates adipocyte function and protects against diet-induced insulin resistance and inflammation // *FASEB J.* 2012. Vol. 26. N 8. P. 3393–3411.
81. *Gargantini E., Lazzari L., Settanni F., Taliano M., Trovato L., Gesmundo I., Ghigo E., Granata R.* Obestatin promotes proliferation and survival of adult hippocampal progenitors and reduces amyloid- $\beta$ -induced toxicity // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2016. Vol. 422. P. 18–30.
82. *Pradhan G., Wu C.S., Lee J.H., Kanikarla P., Guo S., Yechoor V. K., Samson S. L., Sun Y.* Obestatin stimulates glucose-induced insulin secretion through ghrelin receptor GHS-R // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. N 1: 979.

83. Szakács J., Csabafi K., Lipták N., Szabó G. The effect of obestatin on anxiety-like behaviour in mice // *Behav. Brain Res.* 2015. Vol. 293. P. 41–45.
84. Fekete E.M., Zhao Y., Szücs A., Sabino V., Cottone P., Rivier J., Vale W.W., Koob G. F., Zorrilla E.P. Systemic urocortin 2, but not urocortin 1 or stressin1-A, suppresses feeding via CRF2 receptors without malaise and stress // *Br. J. Pharmacol.* 2011. Vol. 164. N 8. P. 1959–1975.
85. Ataka K., Inui A., Asakawa A., Kato I., Fujimiya M. Obestatin inhibits motor activity in the antrum and duodenum in the fed state of conscious rats // *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 2008. Vol. 294. N 5. P. G1210–G1218.
86. Wellman P.J. Modulation of eating by central catecholamine systems // *Curr. Drug Targets.* 2005. Vol. 6. N 2. P. 191–199.
87. Tecott L.H. Serotonin and the orchestration of energy balance // *Cell Metab.* 2007. Vol. 6. N 5. P. 352–361.
88. Brunetti L., Michelotto B., Orlando G., Vacca M. Leptin inhibits norepinephrine and dopamine release from rat hypothalamic neuronal endings // *Eur. J. Pharmacol.* 1999. Vol. 372. N 3. P. 237–240.
89. Brunetti L., Recinella L., Orlando G., Michelotto B., Di Nisio C., Vacca M. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus // *Eur. J. Pharmacol.* 2002. Vol. 454. N 2–3. P. 189–192.
90. Brunetti L., Orlando G., Ferrante C., Chiavaroli A., Vacca M. Peptide YY (3–36) inhibits dopamine and norepinephrine release in the hypothalamus // *Eur. J. Pharmacol.* 2005. Vol. 519. N 1–2. P. 48–51.
91. Motorykina E.S., Khirazova E.E., Maslova M.V., Maklakova A.S., Graf A.V., Bayzhymanov A.A., Kurko O.D., Zamyatina L.A., Andreyeva L.A., Sokolova N.A., Myasoyedov N.F., Kamenskii A.A. Changes in feeding and drinking motivations and glucose content in male rats after single or chronic administration of obestatin or its fragment (1–4) // *Dokl. Biol. Sci.* 2015. Vol. 460. P. 1–4.
92. Samson W.K., Yosten G.L.C., Chang J.K., Ferguson A.V., White M.M. Obestatin inhibits vasopressin secretion: evidence for a physiological action in the control of fluid homeostasis // *J. Endocrinol.* 2008. Vol. 196. N 3. P. 559–564.
93. Agnew A., Calderwood D., Chevallier O.P., Greer B., Grieve D.J., Green B.D. Chronic treatment with a stable obestatin analog significantly alters plasma triglyceride levels but fails to influence food intake; fluid intake; body weight; or body composition in rats // *Peptides.* 2011. Vol. 32. N 4. P. 755–762.
94. Bliss E.S., Whiteside E. The gut-brain axis, the human gut microbiota and their integration in the development of obesity // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9: 900.
95. Fujimiya M., Ataka K., Asakawa A., Chen C.Y., Kato I., Inui A. Regulation of gastrooduodenal motility: acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin and hypothalamic peptides // *Digestion.* 2012. Vol. 85. N 2. P. 90–94.
96. Chen C.Y., Lee W.J., Chong K., Lee S.D., Liao Y.D. Impact of intracerebroventricular obestatin on plasma acyl ghrelin, des-acyl ghrelin and nesfatin-1 levels, and on gastric emptying in rats // *Mol. Med. Rep.* 2012. Vol. 6. N 1. P. 191–196.
97. Bassil A.K., Häglund Y., Brown J., Rudholm T., Hellström P.M., Näslund E., Lee K., Sanger G.J. Little or no ability of obestatin to interact with ghrelin or modify motility in the rat gastrointestinal tract // *Br. J. Pharmacol.* 2007. Vol. 150. N 1. P. 58–64.
98. Grande C., Gesmundo I., Settanni F., Taliano M., Gallo D., Gargantini E., Ghigo E., Granata R. Obestatin enhances in vitro generation of pancreatic islets through regulation of developmental pathways // *PLoS One.* 2013. Vol. 8. N 5.
99. Ren A.J., Guo Z.F., Wang Y.K., Wang L.G., Wang W.Z., Lin L., Zheng X., Yuan W.J. Inhibitory effect of obestatin on glucose-induced insulin secretion in rats // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. Vol. 369. N 3. P. 969–972.
100. Gao X.Y., Kuang H.Y., Liu X.M., Wang X.Y., Pan Y.H., Ma X.X. Decreased obestatin in plasma in metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance // *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2008. Vol. 79. N 1. P. e5–e6.
101. Fujimiya M., Asakawa A., Ataka K., Kato I., Inui A. Different effects of ghrelin, des-acyl ghrelin and obestatin on gastrooduodenal motility in conscious rats // *World J. Gastroenterol.* 2008. Vol. 14. N 41. P. 6318–6326.
102. Morley J.E., Farr S.A., Sell R.L., Hileman S.M., Banks W.A. Nitric oxide is a central component in neuropeptide regulation of appetite // *Peptides.* 2011. Vol. 32. N 4. P. 776–780.
103. Agnew A.J., Robinson E., McVicar C.M., Harvey A.P., Ali I.H.A., Lindsay J.E., McDonald D.M., Green B.D., Grieve D.J. The gastrointestinal peptide obestatin induces vascular relaxation via specific activation of endothelium-dependent NO signalling // *Br. J. Pharmacol.* 2012. Vol. 166. N 1. P. 327–338.
104. Penna C., Tullio F., Femmino S., Rocca C., Angelone T., Cerra M.C., Gallo M.P., Gesmundo I., Fanciulli A., Brizzi M.F., Pagliaro P., Alloati G., Granata R. Obestatin regulates cardiovascular function and promotes cardioprotection through the nitric oxide pathway // *J. Cell. Mol. Med.* 2017. Vol. 21. N 12. P. 3670–3678.
105. Vergote V., Baert B., Vandermeulen E., Peremans K., van Bree H., Slegers G., Burvenich C., De Spiegeleer B. LC-UV/MS characterization and DOE optimization of the iodinated peptide obestatin // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008. Vol. 46. N 1. P. 127–136.
106. Khirazova E.E., Maslova M.V., Motorykina E.S., Frid D.A., Graf A.V., Maklakova A.S., Sokolova N.A., Kamenskii A.A. Effects of single intranasal administration of obestatin fragments on the body weight and feeding and drinking behaviors // *Dokl. Biol. Sci.* 2013. Vol. 453. N 1. P. 336–337.
107. Subasinghage A.P., Green B.D., Flatt P.R., Irwin N., Hewage C.M. Metabolic and structural properties of human obestatin {1–23} and two fragment peptides // *Peptides.* 2010. Vol. 31. N 9. P. 1697–1705.
108. Motorykina E.S., Khirazova E.E., Maslova M.V., Graf A.V., Maklakova A.S., Bayzhymanov A.A., Kurko O.D., Andreyeva L.A., Sokolova N.A., Myasoyedov N.F., Kamenskii A.A. Changes in behavior and blood corticosterone level in male and female rats after single administration of obestatin fragment 1–4 // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2016. Vol. 161. N 2. P. 218–220.

Поступила в редакцию 18.03.2020 г.

После доработки 12.04.2020 г.

Принята в печать 17.05.2020 г.

## REVIEW

## Obestatin and its fragments: a new approach to the regulation of body weight in normal and pathological conditions

A.V. Graf<sup>1, 2</sup>, E.E. Khirazova<sup>1</sup>, M.V. Maslova<sup>1,\*</sup>, N.A. Sokolova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, 119234 Moscow, Russia;*

<sup>2</sup>*Institute of Nano-, Bio-, Informational, Cognitive and Socio-humanistic Sciences and Technologies, Moscow Institute of Physics and Technology, Maximova Street 4, 123098 Moscow, Russia*

\**e-mail: maslova\_masha@mail.ru*

Gastrointestinal diseases and eating disorders are among the most common pathologies in the world. One of the most widespread and dangerous consequence of many eating disorders is an uncontrolled weight gain that often leads to obesity. This review focuses on the 15-year-long studies of obestatin – one of the potential regulators of the eating behavior. This peptide contains 23 amino-acids and appears due to the processing of preproghrelin responsible for the coding of another orexigenic protein ghrelin. Obestatin and ghrelin have multiple physiological functions including the appetite regulation. Obestatin was originally obtained from the gastric mucosa in rats, but subsequent studies showed that it could be expressed in various tissues and had different effects in various organs and tissues. This review emphasizes possible anorexigenic effects of this peptide and their mechanisms. Despite the 15 years of research on obestatin, its influence on different organs and the mechanism of anorexigenic effects, in particular, bring about a lot of discussion. This is primarily due to the ambiguity of the peptide receptors determination, and is also related to the possible degradation of the molecule into the small fragments, which, in turn, can have their own effects. The local effects of obestatin and its derivatives in peripheral tissues and the possible effect at the central level indicate the potential of these peptides for the further studies. For example, these compounds can be considered as the potential therapeutic substances for eating disorders treatment. The aim of this work was to describe the relevance of the problem connected with obesity treatment and to summarize the results of numerous studies on obestatin and its fragments and their effects on the appetite regulation in order to explain its possible mechanisms.

**Keywords:** *obestatin, eating behavior regulators, eating disorders, orexigenic peptides, anorexigenic peptides, obesity*

### Сведения об авторах

*Граф Анастасия Викторовна* – канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: *nastjushka@gmail.com*.

*Хиразова Елизавета Эдуардовна* – канд. биол. наук, ассистент кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: *ekhirazova@gmail.com*.

*Маслова Мария Вадимовна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: *maslova\_masha@mail.ru*.

*Соколова Наталия Александровна* – докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета. Тел.: 8-495-939-46-04; e-mail: *1945@mail.ru*.

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 576.316.353.7.087

**Цитогенетическое изучение *Aegopodium podagraria* (Umbelliferae) для ее использования в селекции****Д.В. Романов\*, С.Ю. Ширнин, Г.И. Карлов, М.Г. Дивашук**

*Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии,  
Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42  
\*e-mail: akabos1987@gmail.com*

Сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.) обладает рядом хозяйственно-ценных признаков (использование в пищу, отличный медонос, высокая кормовая ценность), а также обладает противоревматическим, мочегонным, успокоительным и ранозаживляющим действием. В этой работе мы использовали растения *A. podagraria* для цитогенетических исследований. Для сбора коллекции *A. podagraria* была проведена экспедиция по территории России. В ходе экспедиции *A. podagraria* не была обнаружена там, где часто случаются засухи и пересыхает верхний слой почвы. Приготовление цитологических препаратов метафазных хромосом *A. podagraria* было проведено модифицированным нами методом распластывания суспензии клеток, который совмещает в себе преимущества различных методик и превосходит их по качеству и количеству метафаз на препаратах. В результате подсчета хромосом было обнаружено, что растения сныти из коллекции имеют 42 хромосомы. Существенные различия в кариотипах *A. podagraria* из разных регионов не были обнаружены, поскольку эти различия были не более выраженными, чем индивидуальные различия метафазных пластинок одного растения. Для более точной идентификации хромосом и их отдельных участков для сопровождения селекционного процесса необходимо продолжить работу с целью создания цитогенетических маркеров *A. podagraria*.

**Ключевые слова:** *Aegopodium podagraria*, сныть обыкновенная, метафаза, кариотип, хромосома, идиограмма

Сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.) – многолетнее травянистое растение семейства зонтичных (Umbelliferae). Это уникальное растение, имеющее ряд хозяйственно-ценных признаков: используется в пищу, является отличным медоносом, обладает высокой кормовой ценностью. У *A. podagraria* долгая история использования в медицине, в Средние века ее выращивали в качестве лекарственной травы. Все части растения обладают противоревматическим, мочегонным, успокоительным и ранозаживляющим действием [1–3]. В России распространена широко почти по всей европейской части от Карелии до Пермского края и Саратовской области, а также в южной полосе Сибири до Байкала и на Северном Кавказе [4], что свидетельствует о ее устойчивости к болезням, вредителям, неблагоприятным погодным условиям [5]. Эти качества позволяют рекомендовать сныть для использования в селекции сельскохозяйственно важных представителей семейства зонтичных, таких как морковь, сельдерей, укроп, петрушка, кориандр, тмин и другие.

Для этого необходимо проводить селекционную работу по переносу генов хозяйственно ценных признаков (устойчивости к болезням и вреди-

телям, химического состава и др.) от сныти другим сельскохозяйственно важным представителям зонтичных. Выравнивание ДНК-последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS) показало, что *A. podagraria* филогенетически ближе всего к таким хозяйственно ценным растениям, как тмин обыкновенный (*Carum carvi* L.) и кориандр посевной (*Coriandrum sativum* L.) [6], что делает их наиболее подходящими кандидатами для межвидовой гибридизации с *A. podagraria*. В свою очередь эти гибриды могут быть использованы как промежуточное звено для более отдаленной гибридизации сныти и моркови (*Daucus carota* L.). Ранее были получены только соматические гибриды (путем слияния протопластов) *A. podagraria* и *D. carota* [7], фенотипически больше похожие на *A. podagraria*, но у них было отмечено повышенное содержание каротиноидов.

Для повышения продуктивности селекционной работы необходимо изучать сныть на молекулярно-генетическом и цитогенетическом уровнях. *A. podagraria* остается генетически малоизученным видом: в базе данных NCBI размещено лишь 74 нуклеотидных последовательности этого растения. Что касается цитогенетики, то у *A. podagraria*

это направление также слабо развито: было посчитано число хромосом, но без построения кариотипов, при этом были обнаружены разные популяции *A. podagraria* с разным числом хромосом ( $2n$ ): 22, 38, 39, 42 и 44 [8–10]. Подобные различия в числе хромосом можно наблюдать и у других представителей зонтичных – рода *Daucus* (морковь):  $2n = 18$  (*D. carota* и *D. capillifolius*),  $2n = 20$  (*D. guttatus*, *D. littoralis* и *D. muricatus*),  $2n = 22$  (*D. crinitus*, *D. hispidifolius* и *D. pusillus*),  $2n = 44$  (*D. glochidiatus*) [11]. Это обусловило необходимость сбора растений сныти из разных мест произрастания для дальнейшего ее молекулярно-цитогенетического изучения.

С учетом ценности сныти как донора генов хозяйственно ценных признаков очевидна актуальность изучения ее хромосом. Для того чтобы использовать *A. podagraria* в селекционных программах, необходимо, прежде всего, провести кариотипирование хромосомы для их идентификации, поэтому целью настоящей работы стало цитологическое изучение хромосом сныти обыкновенной. Для сбора коллекции *A. podagraria* нами были обследованы обширные территории России: европейская часть (Московская область и некоторые прилегающие области), Кавказ, а также южная полоса Сибири до Байкала. Также нами разработан высокоэффективный метод приготовления препаратов хромосом *A. podagraria* и получены цитологические препараты метафазных хромосом для всех изучаемых индивидуальных растений сныти обыкновенной.

### Материалы и методы

Растительный материал был идентифицирован согласно атласу-определителю [12]. *A. podagraria* – многолетник с длинным, тонким, горизонтальным, сильноветвистым белым корневищем. Прикорневые листья длинночерешковые, дважды тройчатые, сегменты 2-го порядка – яйцевидные или продолговато-яйцевидные, остропильчатые. Верхние листья тройчатые. Пластинки листьев с нижней стороны, особенно по жилкам, опушенные. Верхушечный зонтик с 12–25 лучами. Цветки обоеполые, плодущие; боковые зонтики обычно бесплодные. Высота стебля от 40 до 100 см. Стебель голый, полый, слабо ветвистый. Период цветения – июнь-июль, период плодоношения – июль-август. Произрастает в смешанных и широколиственных лесах, редколесьях, оврагах.

Для сбора коллекции *A. podagraria* была проведена экспедиция по территории России. Перед экспедицией для определения оптимального способа транспортировки растений был проведен эксперимент по высушиванию корневищ сныти с последующим высаживанием в оранжерею. Было обнаружено, что растение полностью погибает после 5-дневного высушивания корневищ

при комнатной температуре, поэтому транспортировали растения во влажном грунте.

В ходе экспедиции, которая проводилась с 20.08.2018 г. по 20.10.2018 г., нами были обследованы обширные территории России, протяженность маршрута составила около 23 тыс. км (таблица).

Растения выкапывали и транспортировали с корневищем в плодородном грунте, полив проводили регулярно, исключая возможность пересыхания грунта. В каждой точке сбора было взято по два растения.

В условиях лаборатории коллекция была сначала выдержана в яровизационной камере, а затем высажена в горшки в оранжерее. Все растения хорошо перенесли транспортировку и яровизацию.

Интересно отметить, что растения сныти из южных регионов России (Краснодарский и Ставропольский край) продолжали вегетацию во время яровизации, в то время как у остальных растений отмирала надземная часть, отрастание наблюдали только после высадки в оранжерею.

Нами были опробованы и модифицированы различные методики приготовления препаратов *A. podagraria* (раздавливания [13], распластывания [14], раскапывания [15] и метод «паровой капли» [16]). Они были использованы при разработке метода распластывания суспензии клеток, который совмещает в себе преимущества различных методик и в результате превосходит их по качеству и количеству метафаз на препаратах. Для увеличения митотического индекса были использованы различные цитостатики – колхицин, альфа-бромнафталин, гидроксимочевина, гидроксихинолин. Наибольшее число метафаз наблюдали в вариантах с использованием гидроксихинолина или колхицина. После получения корней с высоким митотическим индексом их помещали на 24 ч в фиксатор Кларка (3 части 96%-ного этилового спирта : 1 часть ледяной уксусной кислоты), промывали в дистиллированной воде, обрабатывали смесью ферментов (1% пектиназы, 1% целлюлазы, 1% гемицеллюлазы, 1% цитогеликазы) и проводили двукратное замораживание-размораживание ферментированных корневых меристем. Это позволило улучшить равномерность ферментации корневых меристем и разброс хромосом на метафазных пластинках. После этого раскапывали суспензии ферментированных корневых апикальных меристем на предметное стекло с последующей обработкой 60%-ной уксусной кислотой при температуре 42°C и распластыванием фиксатором Кларка, а также промывкой 96%-ным этанолом и высушиванием.

Для отработки метода микроскопию проводили на увеличении  $\times 20$  в фазовом контрасте без окрашивания хромосом. Этого достаточно для быстрой оценки качества препарата и количества метафазных пластинок. Было обнаружено, что колхи-

цин сильно укорачивает хромосомы, что снижает точность измерения длины и центромерного индекса. Поэтому в качестве цитостатика было решено использовать только гидроксихинолин.

Методом распластывания суспензии клеток были получены качественные цитологические препараты метафазных хромосом для всех собран-

ных в ходе экспедиции растений, на каждом препарате было от 15 до 120 метафазных пластинок с хорошим разбросом хромосом. Для более точного определения количества хромосом, контуров хромосом, спутников и положения центромеры было проведено окрашивание хромосом с помощью неинтеркалирующего красителя DAPI

Таблица

Коллекция растений, собранных в ходе экспедиции

№	Место сбора	Вид	GPS-координаты
1, 1'	Владимирская обл., р. Нерль	<i>A. podagraria</i>	56°12'15.5»N 40°35'07.7»E
2, 2'	Нижегородская обл., п. Тарасиха	<i>A. podagraria</i>	56°42'21.4»N 44°14'00.3»E
3, 3'	Кировская обл., д. Ракалово	<i>A. podagraria</i>	58°57'23.9»N 50°55'25.1»E
4, 4'	Кировская обл., р. Кама	<i>A. podagraria</i>	58°49'40.9»N 53°24'55.4»E
5, 5'	Пермский край, п. Суксун	<i>A. podagraria</i>	57°09'28.0»N 57°13'16.8»E
6, 6'	Свердловская обл., ост. Зелёный мыс	<i>A. podagraria</i>	56°50'18.3»N 60°07'08.8»E
7, 7'	Новосибирская обл., г. Новосибирск	<i>A. podagraria</i>	55°06'33.3»N 82°54'26.2»E
8, 8'	Новосибирская обл., р. Ояш	<i>A. podagraria</i>	55°31'56.2»N 83°51'50.8»E
9, 9'	Кемеровская обл., д. Чаша	<i>A. podagraria</i>	55°24'48.0»N 85°16'09.2»E
10, 10'	Кемеровская обл., р. Суловка	<i>A. podagraria</i>	56°11'34.6»N 88°04'08.2»E
11, 11'	Иркутская обл., г. Братск	<i>A. sylvestris</i>	56°11'34.6»N 88°04'08.2»E
12, 12'	Красноярский край, р. Быковая	<i>A. sylvestris</i>	55°57'35.4»N 92°40'45.5»E
13, 13'	Красноярский край., г. Дивногорск	<i>A. sylvestris</i>	55°56'15.0»N 92°15'30.6»E
14, 14'	Красноярский край, р. Малый Терел	<i>A. sylvestris</i>	55°58'19.2»N 91°55'27.6»E
15, 15'	Красноярский край, п.г.т. Козулька	<i>A. sylvestris</i>	56°11'12.0»N 91°24'14.9»E
16, 16'	Красноярский край, с. Критово	<i>A. podagraria</i>	56°12'53.0»N 89°57'56.6»E
17, 17'	Кемеровская обл., д. Чаша	<i>A. podagraria</i>	55°25'03.1»N 85°15'55.1»E
18, 18'	Новосибирская обл., р. Истанка	<i>A. podagraria</i>	55°37'32.3»N 84°17'48.3»E
19, 19'	Новосибирская обл., р. Ояш	<i>A. podagraria</i>	55°31'56.3»N 83°51'50.5»E
20, 20'	Новосибирская обл., г. Новосибирск, р. Ельцовка	<i>A. podagraria</i>	5°03'56.9»N 82°53'07.5»E
21, 21'	Новосибирская обл., г. Новосибирск, р-н Шлюз	<i>A. podagraria</i>	54°51'24.7»N 83°03'36.3»E
22, 22'	Свердловская обл., п.г.т. Дружинино	<i>A. podagraria</i>	56°48'58.4»N 59°21'13.2»E
23, 23'	Свердловская обл., д. Сажина	<i>A. podagraria</i>	56°47'44.4»N 58°28'52.6»E
24, 24'	Пермский край, с. Сабарка	<i>A. podagraria</i>	57°09'30.9»N 57°15'17.2»E
25, 25'	Пермский край, с. Чайка	<i>A. podagraria</i>	56°52'43.1»N 56°40'16.5»E
26, 26'	Башкирия, с. Артакуль	<i>A. podagraria</i>	55°51'21.3»N 56°27'03.5»E
27, 27'	Башкирия, д. Ерма-Елань	<i>A. podagraria</i>	56°06'49.8»N 56°24'09.2»E
28, 28'	Пермский край, д. Караморка	<i>A. podagraria</i>	56°37'22.2»N 56°09'25.8»E
29, 29'	Пермский край, р. Пизя	<i>A. podagraria</i>	57°30'45.3»N 55°41'12.3»E
30, 30'	Пермский край, п. Менделеево	<i>A. podagraria</i>	58°09'45.1»N 55°01'11.1»E
31, 31'	Костромская обл., п. Зебляки	<i>A. podagraria</i>	58°23'01.7»N 45°46'32.5»E
32, 32'	Нижегородская обл., г. Ветлуга	<i>A. podagraria</i>	57°50'34.4»N 45°49'13.0»E
33, 33'	Нижегородская обл., г. Семенов	<i>A. podagraria</i>	56°46'00.9»N 44°24'26.4»E
34, 34'	Нижегородская обл., г. Арзамас	<i>A. podagraria</i>	55°25'00.9»N 43°51'14.9»E
35, 35'	Нижегородская обл., р. Сатис	<i>A. podagraria</i>	54°54'54.6»N 43°15'57.4»E
36, 36'	Воронежская обл., с.н.т. Искра	<i>A. podagraria</i>	51°51'59.9»N 39°12'58.2»E
37, 37'	Краснодарский край, р. Кобза	<i>A. podagraria</i>	44°31'17.6»N 38°55'09.3»E
38, 38'	Краснодарский край, р. Туапсе	<i>A. podagraria</i>	44°09'55.5»N 39°11'39.8»E
39, 39'	Краснодарский край, р. Мзымта	<i>A. podagraria</i>	43°33'43.6»N 39°59'50.2»E
40, 40'	Краснодарский край, с. Казачий брод	<i>A. podagraria</i>	43°30'43.2»N 39°59'21.9»E
41, 41'	Ставропольский край, г. Ессентуки	<i>A. podagraria</i>	44°00'17.9»N 42°47'40.0»E
42, 42'	Тульская обл., г. Тула, с.н.т. Комарки	<i>A. podagraria</i>	54°14'13.0»N 37°41'25.3»E
43, 43'	Московская обл., парк Лосиный остров	<i>A. podagraria</i>	55°52'48.9»N 37°47'03.3»E
44, 44'	Кемеровская обл., г. Калтан	<i>A. podagraria</i>	53°30'28.5»N 87°17'09.0»E
45, 45'	Новосибирская обл., г. Новосибирск, Ботсад	<i>A. podagraria</i>	55°03'45.6»N 82°53'20.9»E
46, 46'	Кемеровская обл., г. Березовский	<i>A. podagraria</i>	55°33'08.9»N 86°12'08.0»E
47, 47'	Красноярский край, руч. Чанчиков	<i>A. sylvestris</i>	55°57'26.5»N 93°20'18.2»E
48, 48'	Иркутская обл., р. Иркут	<i>A. sylvestris</i>	51°46'02.7»N 103°14'54.6»E

(Thermo Fisher Scientific, США), после этого препараты были накрыты покровным стеклом с использованием среды для стабилизации флуоресцентного сигнала Vectashield (Vector Laboratories, США), микроскопию проводили с увеличением 100 с использованием иммерсии. Морфометрия и кариотипирование метафазных пластинок были проведены с помощью разработанной нами ранее программы DRAWID [17]. Были проанализированы все 82 индивидуальных растения *A. podagraria*, минимум по 12 метафазных пластинок для каждого растения.

### Результаты и обсуждение

Была собрана уникальная коллекция, состоящая из 82 растений *A. podagraria* и 14 растений *Angelica sylvestris* (Umbelliferae) из 48 различных мест (таблица). Всего было обследовано 24 региона РФ.

В ходе экспедиции *A. podagraria* не была обнаружена там, где часто случаются засухи и пересыхает верхний слой почвы. Например, на Кавказе снять удалось найти только возле рек или ручьев, во влажном микроклимате. Растения *A. sylvestris* были собраны там, где не произрастала *A. podagraria*, поскольку эти растения фенотипически похожи в молодом возрасте (пока полностью не сформированы листовые пластинки), имеют идентичное выпукло-вогнутое сечение стебля и идентичные вкус и запах надземной части растения.

Растения *A. sylvestris* из-за их сходства с *A. podagraria* предположительно могли быть исследованы другими учеными, которые думали, что это *A. podagraria*, в работах с подсчетом числа хромосом. По этой причине нами были также собраны растения *A. sylvestris*, чтобы подтвердить или опровергнуть ошибку предыдущих исследований. Во взрослом состоянии эти растения легко отличить друг от друга по форме листьев и соцветий, также у *A. sylvestris* более мощное корневище.

В результате микроскопии полученных препаратов было обнаружено, что число хромосом у растений *A. podagraria* из коллекции составляет  $2n = 42$ , а у растений *A. sylvestris* —  $2n = 22$ .

Можно предположить, что растения *A. podagraria* с другим количеством хромосом не попали в коллекцию, что маловероятно с учетом большого количества растений в выборке и протяженности маршрута экспедиции. Также возможно, что при подсчете хромосом другими исследователями были допущены ошибки из-за некачественных препаратов. Этим можно объяснить близкие числа хромосом (38, 39, 44), описанные ранее [8, 10]. Что касается данных о сныти с числом хромосом  $2n = 22$  [9] — это, предположительно, фенотипически похожее растение другого вида, например *A. sylvestris*.

С помощью разработанной нами ранее программы DRAWID [17] были проведены кариотипирование *A. podagraria* из разных регионов на основе измерения длин и оценки центромерного индекса хромосом (не менее чем 12 метафазных пластинок для каждого растения) и последующая статистическая обработка данных (рис. 1, 2). В результате существенные различия в кариотипах сныти из разных регионов не были обнаружены, поскольку эти различия были не больше, чем индивидуальные различия метафазных пластинок одного растения.

Различия в длине гомологичных хромосом разных метафазных пластинок одного растения были обусловлены неравномерностью конденсации хроматина и фазой клеточного цикла (ранняя и поздняя метафаза) [18]. Различия в длине гомологичных хромосом наблюдали также внутри одной метафазы из-за неравномерности конденсации хроматина и из-за расположения объемной хромосомы на плоском стекле (например, плечо хромосомы может изогнуться в вертикальной плоскости и этого не будет видно на 2D-изображении). С учетом этих различий была составлена обобщенная идиограмма хромосом *A. podagraria* (рис. 2).

Как видно на рис. 1 и 2, некоторые хромосомы довольно сложно отличить друг от друга (хромосомы 9 и 10, 14 и 15), поскольку различия их длин в среднем не превышают 0,1 мкм, а различия центромерного индекса в среднем не превы-

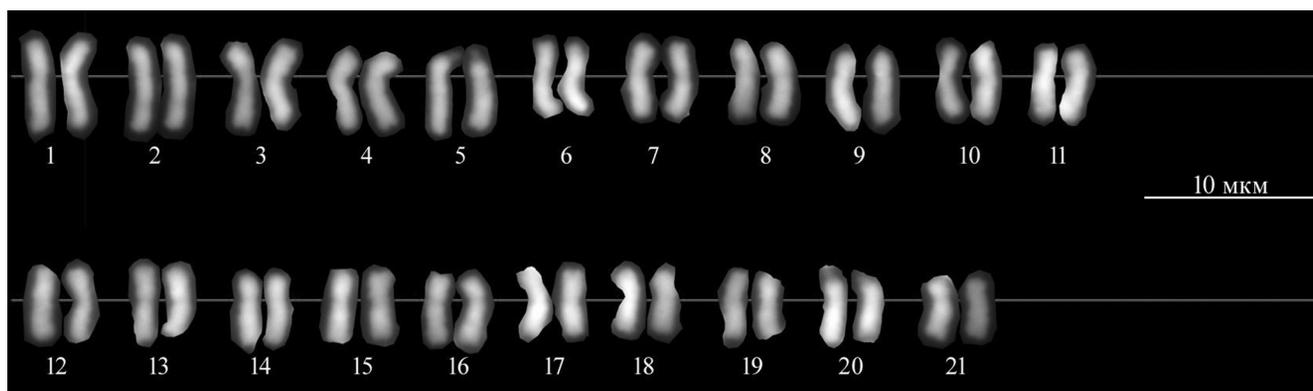


Рис. 1. Кариотип *A. podagraria*

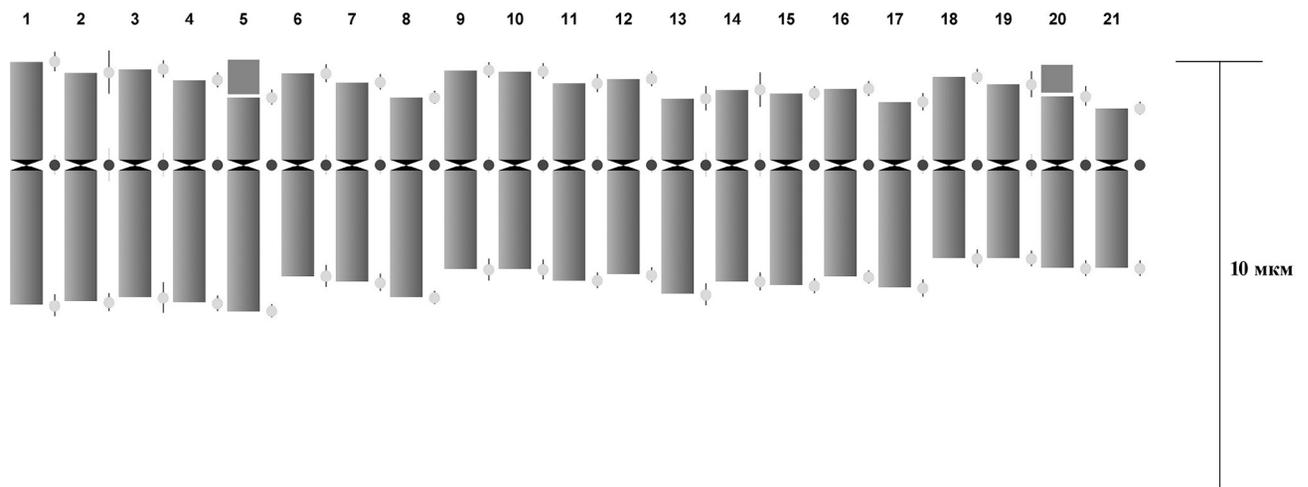


Рис. 2. Идиограмма хромосом *A. podagraria*, построенная в программе DRAWID

шают 2%. Для их безошибочной идентификации в дальнейшем мы планируем создать цитогенетические маркеры на основе повторяющихся элементов генома.

Таким образом, в результате проведенных цитологических исследований нами были построены кариотип и идиограмма хромосом *A. podagraria*. Для более точной идентификации хромосом и их отдельных участков для сопровождения селекционного процесса необходимо продолжить работу с целью создания цитогене-

тических маркеров. Также будут продолжены поиски растений *A. podagraria* с числом хромосом, отличным от 42, в более удаленных и изолированных местах произрастания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 18-76-00018). Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wittig R. The origin and development of the urban flora of Central Europe // Urban Ecosyst. 2004. Vol. 7. N 4. 323–329.
2. Nilsson J., D’Hertefeldt, T. Origin matters for level of resource sharing in the clonal herb *Aegopodium podagraria* // Evol. Ecol. 2008. Vol. 22. N 3. 437–448.
3. Stefanovic O., Comic L., Stanojevic D., Sukdolak S.S. Antibacterial activity of *Aegopodium podagraria* L. extracts and interaction between extracts and antibiotics // Turk. J. Biol. 2009. Vol. 33. N 2. 145–150.
4. Flora Europaea. Vol. 2. Rosaceae to Umbelliferae / Eds. T.G. Tutin, V.H. Heywood, N.A. Burges, D.M. Moore, D.H. Valentine, S.M. Walters, and D.A. Webb. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1968. 469 pp.
5. Tina D., Eneström J.M., Pettersson L.B. Geographic and habitat origin influence biomass production and storage translocation in the clonal plant *Aegopodium podagraria* // PLoS One. 2014. Vol. 9. N 1: e85407.
6. Papini A., Banci F., Nardi E. Molecular evidence of polyphyly in the plant genus *Carum* L. (Apiaceae) // Genet. Mol. Biol. 2007. Vol. 30. N 2. 475–482.
7. Dudits D., Hadlaczky G.Y., Bajszar G.Y., Koncz C.S., Lazar G., Horvath G. Plant regeneration from intergeneric cell hybrids // Plant Sci. Lett. 1979. Vol. 15. N 2. 101–112.
8. Степанов Н.В. Числа хромосом некоторых таксонов высших растений флоры Красноярского края // Бот. журн. 1994. № 79. 135–139.
9. Probatova N.S., Rudyka E.G., Shatokhina A.V. Advance in chromosome numbers study on vascular flora of the Russian Far East in 2000–2006 // Plants in Monsoon Climate. Proceedings of IV International conference. Vladivostok: BSI DVO RAN, 2007. P. 11–29.
10. Eneström J., Andersson S., D’Hertefeldt T. Partitioning of genetic variation in the weedy clonal herb *Aegopodium podagraria* (Apiaceae) in Sweden // Nord. J. Bot. 2009. Vol. 27. N 5. 437–443.
11. Iovene M., Grzebelus E., Carputo D., Jiang J., Simon, P.W. Major cytogenetic landmarks and karyotype analysis in *Daucus carota* and other Apiaceae // Am. J. Bot. 2008. Vol. 95. N 7. 793–804.
12. Киселева К.В., Майоров С.Р., Новиков В.С. Флора средней полосы России. Москва: Фитон+, 2010. 544 с.
13. Dang J., Zhao Q., Yang X., Chen Z., Xiang S., Liang G. A modified method for preparing meiotic chromosomes based on digesting pollen mother cells in suspension // Mol. Cytogen. 2015. Vol. 8. N 1: 80.
14. Schwarzachner T. Preparation and fluorescent analysis of plant metaphase chromosomes // Plant Cell Division. Methods in Molecular Biology, vol 1370 / Ed. M.C. Cailaud. N.Y.: Humana Press, 2016. P. 87–103.
15. Aliyeva-Schnorr L., Ma L., Houben A. A fast air-dry dropping chromosome preparation method suitable for FISH in plants // J. Vis. Exp. 2015. N 106: e53470.
16. Kirov I., Divashuk M., Van Laere K., Soloviev A., Khrustaleva L. An easy “SteamDrop” method for high quality plant chromosome preparation // Mol. Cytogenet. 2014. Vol. 7. N 1: 21.

17. Kirov I., Khrustaleva L., Van Laere K., Soloviev A., Meeus S., Romanov D., Fesenko I. DRAWID: user-friendly java software for chromosome measurements and idiogram drawing // *Comp. Cytogenet.* 2017. Vol. 11. N 4. 747–757.

18. Romanov D., Divashuk M., Havey M.J., Khrustaleva L. Tyramide-FISH mapping of single genes for development of an integrated recombination and cytogenetic map of

chromosome 5 of *Allium cepa* // *Genome.* 2015. Vol. 58. N 3. 111–119.

Поступила в редакцию 11.09.2019 г.

После доработки 28.10.2019 г.

Принята в печать 03.03.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# Cytogenetic study of *Aegopodium podagraria* (Umbelliferae) for its use in breeding

D.V. Romanov\*, S.Y. Shirnin, G.I. Karlov, M.G. Divashuk

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 42 Timiryazevskaya str., 127550, Moscow, Russia  
\*e-mail: akabos1987@gmail.com

*Aegopodium podagraria* possesses a lot of economically valuable traits: food, excellent honey, high feed value, and also has antirheumatic, diuretic, sedative and wound healing effects. In this work, we used *A. podagraria* plants for cytogenetic studies. The collection of *A. podagraria* was obtained in the expedition on different Russian regions. During the expedition, *A. podagraria* was not found at droughts places with drying soil. Preparation of cytological slides of *A. podagraria* metaphase chromosomes was carried out by our method of spreading a suspension of cells. The method we created combines the advantages of various methods, and surpasses them in the quality and quantity of metaphases in the slides. As a result, it was found that the plants from the collection had 42 chromosomes. No significant differences in the karyotypes of *A. podagraria* from different regions were found, since these differences were no more than the individual differences in the metaphase plates of one plant. For more accurate identification of chromosomes and their individual sectors to accompany the selection process, it is necessary to continue the work and to create cytogenetic markers.

**Keywords:** *Aegopodium podagraria*, ground elder, metaphase, karyotype, chromosome, idiogram

### Сведения об авторах

Романов Дмитрий Викторович – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: akabos1987@gmail.com

Ширнин Сергей Юрьевич – мл. науч. сотр. лаборатории прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: durandal-1707@bk.ru

Карлов Геннадий Ильич – член-корр. РАН, докт. биол. наук, директор ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: iab@iab.ac.ru

Дивашук Михаил Георгиевич – канд. биол. наук, зав. лабораторией прикладной геномики и частной селекции сельскохозяйственных растений ФГБНУ ВНИИСБ. Тел.: 8-499-976-65-44; e-mail: divashuk@gmail.com

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 631.533:582.572.226

**Размножение *in vitro*, рост и развитие *ex situ* редкого вида  
*Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. (Liliaceae)****Г.В. Филиппова\*, В.Г. Дарханова, Н.С. Строева, О.А. Николаева, Д.Н. Андросова***Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, Россия, 677980, г. Якутск, пр. Ленина, д. 41  
\*e-mail: nureeva@yandex.ru*

Показана возможность применения методов и подходов биотехнологии высших растений для сохранения и воспроизводства *Lilium pensylvanicum*. Использование семян в качестве первичных эксплантов позволило без причинения ущерба материнским растениям-донорам ввести вид в культуру *in vitro*. Субкультивирование асептических луковиц на среде Гамборга с половинным составом солей микро- и макроэлементов, обогащенной кинетином (5 мг/л) и индолилуксусной кислотой (1 мг/л), вызывало образование  $3 \pm 1$  луковиц на эксплант. Последующие пассажи на четырех вариантах сред позволили отметить среду Мурасиге-Скуга, дополненную 6-бензиламинопурином (0,4 мг/л), которая стимулировала наилучшее развитие луковиц и рост побегов. Укоренение проводили на безгормональных средах. Впервые проведены многолетние наблюдения за акклиматизацией растений-регенерантов *ex situ*. Пятилетние полевые наблюдения в условиях коллекционного питомника Якутского ботанического сада за выживаемостью, ростом и развитием растений-регенерантов ( $n = 30$ ) показали, что 77% особей успешно акклиматизировались. Массовое цветение и плодоношение было отмечено на четвертом году. Выявлены онтогенетические особенности развития молодых растений, которые выражались морфологической поливариантностью цветков и высокой изменчивостью высоты стебля. Разработанный протокол клонального микроразмножения *Lilium pensylvanicum* и результаты многолетних наблюдений за ростом растений-регенерантов позволяют рекомендовать этот метод для воспроизводства сокращающихся численность ценопопуляций.

**Ключевые слова:** *Lilium pensylvanicum*, культура *in vitro*, клональное микроразмножение, *ex situ*, рост, развитие

В условиях техногенного и антропогенного воздействия на биосферу особую роль приобретают подходы и методы, направленные на сохранение и защиту биологического разнообразия. Наряду с традиционными способами охраны природных экосистем в условиях заповедников, заказников, национальных парков, сохранения редких и исчезающих видов в семенных банках и в условиях интродукции (*ex situ*) все большее внимание заслуживает использование альтернативных биотехнологических методов. В настоящее время эффективные методы культивирования *in vitro* разработаны в отношении значительного числа редких и исчезающих видов растений. Особый интерес вызывает размножение редких и эндемичных видов лилий, что обусловлено необходимостью сохранения генетических ресурсов, пищевой и лекарственной ценностью, а также декоративностью этих растений [1–3]. Успешное использование методов культуры ткани для размножения видов лилий, требующих специальных природоохранных мер, описано для *Lilium rhodopaeum* [1], *L. speciosum* [4], *L. davidii* [2], *L. oxypetalum* [5], *L. mackliniae* [6], *L. brownii* [7] и др.

Для введения различных видов растений в культуру *in vitro* в качестве эксплантов используют надземные и подземные органы, фрагменты их ткани и семена. Лилии можно размножить с использованием нескольких видов тканей и органов, включая листья, стебли, апикальные меристемы побегов, части цветка, семена и луковицы. При клональном микроразмножении лилий для создания регенерационных систем чаще всего используют луковичные чешуи [8]. Лилии, особенно редких видов, как и другие цветочные культуры, часто подвержены болезням. Данный процесс может сопровождаться значительным грибковым и бактериальным инфицированием сегментов изолированных луковиц, что определяет главный недостаток этого типа экспланта. Для некоторых видов лилии с достаточным семенным возобновлением имеются немногочисленные сведения о работах с незрелыми и зрелыми семенами [9, 10]. Вместе с тем такой подход позволяет не наносить ущерб уязвимым природным популяциям, их естественному генетическому разнообразию и особенно важен в отношении популяций северных территорий.

*Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. — многолетнее травянистое растение с белой луковицей. Вид распространён от Енисея до Камчатки, на Курильских островах, Сахалине, севере Монголии, северо-востоке Китая, Кореи. В Якутии это южные, юго-западные и центральные районы (до 64° с.ш.). Неуклонное сокращение численности популяции *L. pensylvanicum* в Якутии в результате чрезмерного использования человеком и их исчезновение близ населённых пунктов требуют необходимости принятия специальных мер по охране вида. Категория и статус редкости вида в Якутии — 2 б [11].

Настоящее исследование направлено на изучение особенности морфогенеза и регенерации в условиях *in vitro*, роста и развития *ex situ* редкого вида *Lilium pensylvanicum*.

### Материалы и методы

Семена *L. pensylvanicum* собраны с растений, произрастающих в коллекционном питомнике многолетней флоры Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны (БС ИБПК).

**Введение в культуру *in vitro*.** Поверхностную стерилизацию семян проводили промыванием, сначала в мыльном растворе (25–30 мин), затем последовательно в проточной и дистиллированной воде. Далее поэтапно семена трижды погружали в свежую порцию стерильной воды, 70%-ный этиловый спирт (1 мин), трехкратно промывали стерильной водой, замачивали в 10%-ном растворе хлорамина (30 мин) и вновь трижды промывали водой. Для удаления излишек воды семена помещали на фильтровальную бумагу. После стерилизации в асептических условиях семена высаживали на безгормональные питательные среды Гамборга с половинным составом минеральных солей ( $\frac{1}{2} B_5$ ) [12] и Мурасиге и Скуга (MS) [13]. Содержание сахарозы составляло 40 г/л. Культивирование семян и проростков проводили в свето-культуральной комнате при  $24 \pm 1^\circ C$ , 16-часовом фотопериоде, освещённости 3000 лк и 70%-ной влажности.

**Микроклональное размножение.** После формирования проростков образовавшиеся листья и корни удаляли, а очищенные луковицы помещали на питательные среды. Для индукции образования адвентивных луковиц использовали две питательные среды, дополненные регуляторами роста:  $\frac{1}{2} B_5$  с 5 мг/л кинетина и 1 мг/л индолил-3-ук-сусной кислоты (ИУК) и MS с 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК. Дальнейшее микроразмножение осуществляли разделением образовавшихся луковиц, которые культивировали на питательных средах  $\frac{1}{2} B_5$  и MS с добавлением 6-бензиламинопурина (БАП) в двух концентрациях — 1 мг/л или 0,4 мг/л. Укоренение проводили на безгормональных питательных средах. Длительность пассажей составляла 60 сут.

Морфологическую характеристику растений-регенерантов осуществляли путем измерения ли-

нейных размеров и подсчета числа корней и побегов.

**Аклиматизация к почвенным условиям *ex situ*.** Высадку растений-регенерантов ( $n = 30$ ) в почву осуществляли в коллекционном питомнике БС ИБПК. Климатические условия участка типичны для Центральной Якутии. Зима продолжительная, морозная и малоснежная, а лето засушливое и жаркое. Годовые перепады температуры по абсолютному минимуму и максимуму достигают  $102^\circ C$ . В июле средняя температура составляет  $18,7^\circ C$ , максимальная достигает  $38^\circ C$ . В январе средняя температура — минус  $43,3^\circ C$ , минимальная — минус  $64^\circ C$ . Годовое количество осадков составляет 247 мм.

При посадке и уходе за растениями-регенерантами использовали общепринятые агротехнические приемы (механическое разрыхление, внесение перегноя и песка, полив, прополка). Высадку растений осуществляли в лунки глубиной 5–10 см, расстояние между которыми составляло 10–15 см. Для создания более благоприятного микроклимата в период приживаемости растений в течение двух недель использовали укрывной материал (лутрасил). Наблюдения за ростом и развитием осуществляли 2–3 раза в неделю в течение всего вегетационного сезона.

Фенологические наблюдения *ex situ* проводили по методу, опубликованному ранее [14]. Учитывали отрастание растений, переход в фазы листообразования и стеблевания, бутонизацию, окрашивание бутонов, цветение, завязывание и созревание семян. При изучении биометрических показателей учитывали линейные размеры стебля (высота), третьего листа (длина и ширина), цветка (диаметр), лепестка (длина и ширина), число листьев и цветков.

Также оценивали всхожесть семян (%), количество вновь образованных луковиц (шт./эксплант), выживание растений-регенерантов (%), количество растений в фазах цветения (%) и плодоношения (%).

**Статистическая обработка результатов.** На этапе введения в культуру *in vitro* в культуральный сосуд высаживали по 20 семян в 4 повторностях. В экспериментах по индукции луковиц каждый эксплант помещали в индивидуальную биологическую пробирку, для каждого варианта формировали группы по 19 шт. Для наблюдений в культуре *ex situ* формировали группу растений из 30 особей. Обработку данных проводили с учетом общепринятых методических указаний по биологической статистике. Результаты экспериментов представлены в виде средней арифметической ( $M$ ) и ее стандартной ошибки ( $\pm SEM$ ). Выборки сравнивали методом одно- и двухфакторного дисперсного анализа (ANOVA), статистическую значимость различий определяли с использованием критерия Даннета для множественного сравнения при уровне

значимости  $p \leq 0,05$ . Расчет проводили с помощью пакета StatPlus v.2007 (AnalystSoft Inc., Германия).

### Результаты и обсуждение

Семенное возобновление и вегетативный коэффициент размножения у некоторых видов и сортов лилий могут отсутствовать или являются незначительными [15, 16]. Вместе с тем применение вегетативных и генеративных органов часто может быть ограничено ввиду технических сложностей доставки биологического материала из мест естественного произрастания. Наличие достаточного семенного возобновления у видов делает предпочтительным использование семян, поскольку такой подход позволяет минимизировать воздействие на природные популяции, а также не нарушает структуру коллекционных питомников в случае отбора образцов из условий интродукции. В этой связи в настоящей работе в качестве исходных эксплантов использовали семена *L. pensylvanicum*. Несмотря на то, что наиболее распространенной средой для культивирования лилии является MS, в ряде экспериментальных исследований в зависимости от поставленных целей использовали среды Гамборга, Лисмайера-Скуга, Уайта, Нича и Нич [8]. В работе Икеда и соавт. [17] сообщалось о лучшем развитии эмбрионов на среде  $\frac{1}{2} B_5$ , чем на среде  $B_5$ . В нашем исследовании в результате проращивания семян на агаризованных питательных средах  $\frac{1}{2} B_5$  и MS всхожесть составляла  $35 \pm 3\%$  и достоверно не различалась при применении двух вариантов среды.

На втором этапе – собственно размножения – индукцию образования адвентивных лукович, обусловленную тотипотентностью клеток, проводили из лукович асептических растений *L. pensylvanicum*. Известно, что данный процесс вызывают внесением в питательную среду ауксинов и цитокининов. При этом содержание цитокининов должно превышать содержание ауксинов. В некоторых работах [16, 18] индукцию образования лукович вызывали добавлением в питательную среду 0,1 мг/л нафтилуксусной кислоты и 10 мг/л кинетина. Нами были использованы две питательные среды:  $\frac{1}{2} B_5$  с добавлением 5 мг/л кинетина и 1 мг/л ИУК, а также MS, дополненную 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л ИУК.

В первом случае культивирование приводило к образованию лукович в количестве  $3 \pm 1$  шт./эксплант, а во втором – лишь у 25% эксплантов формировались дополнительные луковичи ( $4,8 \pm 2$  шт./эксплант). Дальнейшее разделение лукович и культивирование их на четырех различных питательных средах показало, что безгормональная среда MS, а также MS, дополненная БАП в концентрации 0,4 мг/л, вызывали образование в среднем  $18 \pm 1$  шт./эксплант (табл. 1). По этому показателю данные варианты превышали в 1,7 и 0,7 раза два других используемых в исследовании –  $\frac{1}{2} B_5$  и MS с БАП 1,0 мг/л соответственно (табл. 1). Среда MS, содержащая БАП в двух использованных концентрациях, вызывала образование наибольшего числа побегов. Вместе с тем для побегов, развивающихся на среде MS с 1,0 мг/л БАП отмечали более низкие значения длины (в 2,1–2,5 раза) по сравнению с вариантами MS с БАП (0,4 мг/л),  $\frac{1}{2} B_5$  и MS.

Образование и рост корней (число и длина) на безгормональных средах были значительно лучше относительно варианта с добавлением гормона в концентрации 0,4 мг/л. Следует отметить, что в питательной среде MS с БАП в концентрации 1 мг/л не наблюдалось ризогенеза.

Таким образом, при микроклональном размножении *L. pensylvanicum* для развития лукович и образования побегов предпочтительнее использование среды, содержащей БАП в концентрации 0,4 мг/л, а укоренение растений-регенерантов целесообразнее проводить на безгормональных питательных средах.

Пересадка растений-регенератов в почву является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения растений. Наиболее благоприятное время для пересадки – весна или лето. К концу первого вегетационного сезона, в результате акклиматизации к почвенным и температурно-влажностным режимам в условиях *ex situ*, выживаемость составляла 90% (рисунок). После перезимовки, на момент отрастания, отмечено снижение числа выживших растений еще на 10%. Все выжившие растения успешно вегетировали в последующие три года. Вместе с тем на пятом году выживаемость вновь снижалась и составляла 77%.

Таблица 1

Зависимость динамики роста и развития растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* от состава питательных сред

Показатели	Состав питательной среды культивирования								
	$\frac{1}{2} B_5$		MS		MS + БАП 0,4мг/л		MS + БАП 1,0 мг/л		
	30 сут	60 сут	30 сут	60 сут	30 сут	60 сут	30 сут	60 сут	
Число лукович, шт.	8,0±1,0a	10,0±2,0a	11,0±2,0b	17,0±1,0c	14,0±1,0b	18,0±2,0c	9,0±1,0a	14,0±1,0b	
Побеги	число, шт.	5,0±1,0a	9,0±2,0a	6,0±1,0a	10,0±2,0ab	10,0±2,0b	15,0±3,0b	5,0±1,0a	12,0±1,0b
	длина, см.	3,6±0,2a	5,3±0,4a	4,1±0,2b	6,0±0,4a	4,1±0,3ab	5,1±0,5a	1,7±0,2c	2,4±0,2b
Корни	число, шт.	4,0±1,0a	8,0±2,0a	6,0±2,0a	13,0±2,0b	1,0±0,5b	2,0±1,0c	0	0
	длина, см.	1,0±0,3a	2,1±0,4a	1,2±0,2a	2,3±0,3a	0,3±0,2 b	0,3±0,1b	0	0

a, b, c – в каждой строке разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения для соответствующих суток ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, критерий Даннета).

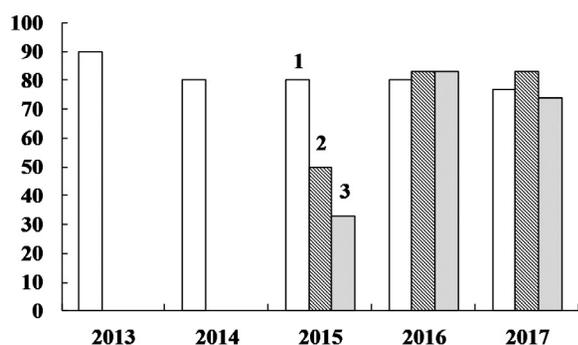


Рисунок. Межгодовая динамика выживаемости, цветения и плодоношения (%) растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* (n = 30) в условиях *ex situ*.

По оси абсцисс – год; по оси ординат – %; 1 – выживаемость; 2 – цветение; 3 – плодоношение.

Ежегодно в период вегетационного сезона проводили фенологические наблюдения за ростом и развитием *L. pensylvanicum*. На третий год после высадки растений-регенерантов в грунт у 50% особей зафиксировано цветение, тогда как завязывание коробочек с семенами отмечено только у 33% особей. На четвертом и пятом годах цвели 83% особей, а завязывание коробочек было у 83% и 74% соответственно (рисунок). Следует отметить, что на четвертом году у некоторых особей наблюдалась морфологическая поливариантность, которая выражалась в увеличении числа лепестков. У трех особей количество лепестков увеличивалось до 8, у двух особей – до 7, тогда как в норме – 6 лепестков. На пятом году было отмечено, что у одной особи цветок состоял из 14 лепестков. Известно, что морфологическая поливариантность растений может быть связана

с экологическими условиями произрастания, включая степень увлажненности, и онтогенетическим состоянием [19]. Вероятно, отмеченная нами поливариантность генеративных органов молодых растений *L. pensylvanicum* обуславливалась возрастными особенностями и погодными условиями вегетационных сезонов. Сравнение морфологических признаков вегетативных и генеративных органов пятилетних растений-регенерантов относительно *L. pensylvanicum*, произрастающих в культуре, показало, что средние значения высоты стебля и числа листьев статистически достоверно выше у средневозрастных растений (табл. 2). Остальные признаки (длина и ширина листа, число и диаметр цветков, длина и ширина лепестка) не различались. При анализе коэффициента вариации установлена высокая изменчивость морфологических признаков у молодых особей растений-регенерантов (высота стебля, число листьев и цветков), тогда как у средневозрастных особей в культуре – число листьев и цветков, длина листа и ширина лепестка. По-видимому, высокая изменчивость числа листьев и цветков, вне зависимости от онтогенетического состояния, является биологической особенностью данного вида.

Сравнение фено ритмики *L. pensylvanicum* растений-регенерантов и растений, произрастающих в культуре, показало, что регенеранты по отрастанию, листообразованию и стеблеванию опережали в среднем на 5–10 сут особей в культуре. Однако бутонизация, окрашивание бутонов, цветение и плодоношение наблюдались раньше на 5–7 сут в культуре (табл. 3).

Таблица 2

Средние значения биометрических показателей и коэффициент вариации у *Lilium pensylvanicum*

Вариант	Высота стебля, см	Число листьев, шт.	Длина листа, см	Ширина листа, см	Число цветков, шт.	Диаметр цветка, см	Длина лепестка, см	Ширина лепестка, см
Растения-регенеранты	44,0±2,2a (21,5)	38,0±3,2a (35,4)	7,9±0,3a (14,9)	0,7±0,1a (17,7)	3,0±0,4a (64,0)	8,3±0,5a (5,42)	6,2±0,1a (5,12)	2,4±0,1a (10,7)
Растения в культуре	58,7±2,0b (18,3)	60,0±4,6b (41,8)	7,2±0,3a (22,9)	0,7±0,1a (21,0)	3,2±0,3a (55,4)	8,9±0,2a (8,57)	6,4±0,1a (9,78)	2,3±0,1a (20,1)

a, b – в каждом столбце разными буквами обозначены достоверно различающиеся значения ( $p \leq 0,05$ , ANOVA, критерий Даннета); в скобках указано значение коэффициента вариации.

Таблица 3

Фенологические фазы растений-регенерантов *Lilium pensylvanicum* и средневозрастных растений в культуре

Год	Отрастание	Листообразование	Стеблевание	Бутонизация	Окрашивание бутонов	Цветение	Завязывание семян	Созревание семян
Растения-регенеранты								
2014	V.23	V.27	VI.03	–	–	–	–	–
2015	V.18	V.25	V.29	VI.18	VI.22	VI.23	VII.02	VIII.17
2016	V.10	V.21	VI.02	VI.14	VI.17	VI.19	VI.28	VIII.25
2017	V.15	V.23	V.28	VI.13	VI.19	VI.21	VI.29	VIII.18
Растения в культуре								
2014	V.12	V.20	V.30	VI.06	VI.16	VI.17	VI.24	VIII.25
2015	V.25	VI.01	VI.06	VI.11	VI.22	VI.22	VII.01	VIII.27
2016	V.17	V.31	VI.03	VI.06	VI.17	VI.17	VI.26	VIII.29
2017	V.26	VI.06	VI.09	VI.09	VI.13	VI.17	VI.25	VIII.27

Проведенные исследования роста и развития растений-регенерантов *L. pensylvanicum* в условиях коллекционного питомника показали, что сохранение и воспроизводство данного вида методом микроклонального размножения является перспективным. Выявленная морфологическая поливариантность цветков, изменчивость высоты стебля, а также сроков прохождения некоторых фенологических фаз, вероятно, обусловлена онтогенетическим состоянием растений.

Разработан протокол микроклонального размножения *in vitro* *L. pensylvanicum* – вида, численность которого сокращается в результате чрезмерного использования человеком и занесенного в Красную книгу Республики Саха (Якутия). Использование семян в качестве первичных эксплантов позволило без причинения ущерба материнским растениям-донорам ввести вид в культуру *in vitro*. Субкультивирование асептических луковиц на среде Гамборга с половинным составом солей микро- и макроэлементов, обогащенной кинетином (5 мг/л) и ИУК (1 мг/л), вызывало образование  $3 \pm 1$  шт. луковиц на эксплант. Установлено, что среда Мурасиге-Скуга, дополненная БАП (0,4 мг/л), являлась наилучшей для развития луковиц и роста побегов. Пятилет-

ние наблюдения за выживаемостью и онтогенетическим развитием растений-регенерантов в условиях *ex situ* показали, что акклиматизацию к почвенным и температурно-влажностным условиям Якутии успешно прошли 77% растений-регенерантов. Массовое цветение и плодоношение отмечалось на четвертый год. Для молодых растений-регенерантов отмечены: морфологическая поливариантность цветков, изменчивость высоты стебля, а также незначительное смещение сроков прохождения вегетативных и генеративных фенологических фаз. Приведенные результаты дают основания предполагать, что использование микроклонального размножения может являться эффективным способом для восстановления природных ценопопуляций *L. pensylvanicum*.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБПК СО РАН на 2017–2020 гг. по проекту VI.52.1.8. «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения разнообразия растительного мира Северной и Центральной Якутии» (№ АААА-А17-117020110056-0).

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stanilova M.I., Ilcheva V.P., Zagorska N.A. Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. // Plant Cell Rep. 1994. Vol. 13. N 8. P. 451–453.
2. LingFei X., FengWang M., Dong L. Plant regeneration from *in vitro* cultured leaves of Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor) // Sci. Hort. Amsterdam. 2009. Vol. 119. N 4. P. 458–461.
3. Yarmolinsky L., Zaccai M., Ben-Shabat Sh., Mills D., Huleihel M. Antiviral activity of ethanol extracts of *Ficus binjamina* and *Lilium candidum in vitro* // New Biotechnol. 2009. Vol. 26. N 6. P. 307–313.
4. Chang Ch., Chen Ch-T., Tsai Y-Ch., Chang W-Ch. A tissue culture protocol for propagation of a rare plant, *Lilium speciosum* Thunb. var. *gloriosoides* Baker // Bot. Bull. Acad. Sinica. 2000. Vol. 41. N 2. P. 139–142.
5. Joshi S.K., Dhar U. In vitro propagation from axenic explants of *Lilium oxypetalum* (D. Don) Baker, an endemic bulbous plant of high altitude Himalaya // Acta Physiol. Plant. 2009. Vol. 31. P. 833–838.
6. Sahoo M.R., Devi M.P., Dasgupta M., Prakash N., Ngachan Sh.V. An efficient protocol for *in vitro* regeneration and conservation of Shirui lily (*Lilium mackliniae* Sealy): a lab-to-land approach to save the rare endangered Asiatic lily species // In Vitro Cell. Dev.-Pl. 2018. Vol. 54. N 6. P. 701–710.
7. Wu Y., Ma Y-D., Li Y., Zhang L., Xia Y-P. Plantlet regeneration from primary callus cultures of *Lilium brownii* F.E.Br. ex Miellez var. *giganteum* G.Y. Li & Z.H. Chen, a rare bulbous germplasm // In Vitro Cell. Dev.-Pl. 2019. Vol. 55. N 1. P. 44–59.
8. Bakhshaie M., Khosravi S., Azadi P., Bagheri H., Tuyul J.M. Biotechnological advances in *Lilium* // Plant Cell Rep. 2016. Vol. 35. N 9. P. 1799–1826.
9. Ault J.R., Siqueira S.S. Morphogenetic response of *Lilium michiganense* to four auxin-type plant growth regulators *in vitro* // Hortscience. 2008. Vol. 43. N 6. P. 1922–1924.
10. Dhyani A., Sharma G., Nautiyal B.P., Nautiyal M.Ch. Propagation and conservation of *Lilium polyphyllum* D. Don ex Royle // J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants. 2014. Vol. 1. N 4. P. 144–147.
11. Красная книга Республики Саха (Якутия). Т. 1: Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды растений и грибов / Отв. ред. Н.С. Данилова. М.: Изд-во Реарт, 2017. 412 с.
12. Gambourg O.L., Elevegh D. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. Vol. 46. P. 417–421.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plantarum. 1962. Vol. 15. N 3. P. 473–476.
14. Бейдемман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Изд-во Наука, 1974. 139 с.
15. Пугачева Г.М., Соколова М.А. Клональное микро-размножение лилий // Вестн. МичГАУ. 2010. № 1. С. 35–37.
16. Степанова А.Ю., Ильина В.С., Староверов В.В., Терешонок Д.В. Микроклональное размножение лилии азиатской // Плодоводство и ягодоводство России. 2011. Т. 26. С. 237–243.
17. Ikeda N., Niimi Y., Han D. Production of seedlings from ovules excised at the zygote stage in *Lilium* spp. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2003. Vol. 73. N 2. P. 159–166.

18. Takayama S., Misawa M. A scheme for mass propagation of *Lilium in vitro* // Sci. Hort.-Amsterdam. 1983. Vol. 18. N 4. P. 353–362.

19. Osmanova G.O. Biomorphology of *Actaea erythrocarpa* Fisch. individuals and ecological–demographic charac-

terization of its cenopopulations // Biology Bull. 2016. Vol. 43. N 5. P. 468–473.

Поступила в редакцию 02.12.2019 г.

После доработки 20.04.2020 г.

Принята в печать 29.04.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# *In vitro* reproduction, *ex situ* growth and development of a rare species *Lilium pensylvanicum* Ker.-Gawl. (Liliaceae)

G.V. Filippova\*, V.G. Darkhanova, N.S. Stroeveva, O.A. Nikolaeva, D.N. Androsova

*Institute for Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,  
41 Lenin st., Yakutsk, 677980, Russia*

\*e-mail: nureeva@yandex.ru

The possibility of applying the methods and approaches of biotechnology of higher plants for the conservation and reproduction of *Lilium pensylvanicum* is shown. The use of seeds as primary explants allowed introducing the species into an *in vitro* culture without causing damage to the donor mother plants. Subculture of bulbs aseptic plants on the Hamburg medium with half the composition of salts micro and macro elements enriched in kinetin (5 mg/l) and indolylacetic acid (1 mg/l) caused the formation of three bulbs per explant. Subsequent passages on four media options allowed to isolate Murashige-Skoog medium supplemented with 6-benzylaminopurine (0.4 mg/l), which stimulated the best development of bulbs and shoot growth. Rooting was performed on hormone-free media. For the first time, long-term observations of the acclimatization of *ex situ* regenerated plants were carried out. Five-year field observations in the conditions of the collection nursery of the Yakutsk Botanical Garden for the survival, growth and development of regenerated plants (n = 30) showed that 77% of individuals successfully acclimatized. Mass flowering and fruiting were noted in the fourth year. Ontogenetic features of the development of young plants were revealed, which were expressed by the morphological polyvariance of the flowers and the high variability of the stem height. The developed protocol for the clonal micropropagation of *Lilium pensylvanicum* the results of long-term observations of the growth of regenerated plants allow us to recommend this method for propagating endangered cenopopulations.

**Keywords:** *Lilium pensylvanicum*, culture *in vitro*, clonal micropropagation, *ex situ*, growth, development

### Сведения об авторах

Филиппова Галина Валерьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: nureeva@yandex.ru

Дарханова Валентина Гаврильевна – инженер-исследователь лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: vdarhana@mail.ru

Строева Наталья Семеновна – инженер-исследователь лаборатории генезиса и экологии почвенно-растительного покрова Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: natali.stroeveva.62@mail.ru

Николаева Ольга Александровна – инженер-исследователь лаборатории Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: olka87.87@mail.ru

Андросова Дария Николаевна – инженер-исследователь лаборатории Ботанического сада Института биологических проблем криолитозоны. Тел: 8-4112-33-56-90; e-mail: darija\_androsova@mail.ru

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 634.22:632.3:578.864

## Молекулярный анализ новых крымских изолятов вируса оспы сливы

А.А. Шевелева<sup>1</sup>, И.В. Митрофанова<sup>2</sup>, В.М. Горина<sup>2</sup>, С.Н. Чирков<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup> Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН, Россия, 298648, г. Ялта, пгт Никита, ул. Никитский спуск, д. 52

\*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Проведен молекулярный анализ новых изолятов вируса оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV), обнаруженных в генофондовых коллекциях персика, абрикоса и сливы Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (НБС), а также на дикорастущих деревьях алычи на прилегающей территории. Методами иммуноферментного анализа и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией выявлено 19 новых изолятов PPV. Большинство принадлежало к штамму D; найдено также по одному изоляту штаммов Res и M. Секвенированы 3'-концевые последовательности генома новых изолятов, включающие ген белка оболочки (БО) и примыкающие последовательности гена *Nlb* и 3'-нетранслируемого региона. При филогенетическом анализе этих последовательностей изоляты PPV-D распределялись в несколько кластеров или клад. Средний уровень дивергенции между последовательностями крымских изолятов PPV-D составил 2,0%. Сравнительно высокий уровень генетической изменчивости указывает на давнюю интродукцию предков нынешних изолятов PPV-D в НБС. Изолят H23, выявленный в коллекции абрикоса, принадлежал к штамму M. Это первое обнаружение PPV-M в Крыму. Изолят AL-Ch (штамм Res) обнаружен на дикорастущей алыче. В БО изолята K87 (штамм D) обнаружена мутация K59T, которая препятствует его распознаванию PPV-D-специфичными моноклональными антителами 4DG5. В БО AL-Ch и охарактеризованных ранее изолятов K28 и Kisl-1pl (штамм Res) обнаружены аминокислотные замены в позиции 68, которые не влияли на распознавание этих изолятов моноклональными антителами AL. По-видимому, позиция 68 находится за пределами PPV-M/Res-специфичного эпитопа. Результаты работы показывают, что, по всей вероятности, PPV проник в НБС с зараженным материалом косточковых культур в результате нескольких независимых интродукций из различных регионов мира и распространился по насаждениям тлями.

**Ключевые слова:** косточковые культуры, генофондовые коллекции, вирус оспы сливы, филогенетический анализ, эпитоп, моноклональные антитела

Вирус оспы сливы (*Plum pox virus*, PPV) вызывает у косточковых культур рода *Prunus* болезнь, называемую шаркой, которая приводит к значительными потерям урожая персика, абрикоса, сливы и других экономически значимых культур из-за массового опадания плодов, ухудшения их качества и непригодности к переработке. Инфекция может угнетать годовой прирост и сокращает продуктивную жизнь растения [1]. PPV относится к роду *Potyvirus* из семейства *Potyviridae*. Вирионы состоят из одной молекулы РНК положительной полярности размером 9,8 тыс. нуклеотидов (нт) и примерно 2 тыс. молекул белка оболочки (БО). Геномная РНК содержит 5'- и 3'-нетранслируемые области, вирусный белок VPg, ковалентно связанный с 5'-концом РНК, и поли-А-последовательность на 3'-конце. РНК транслируется с образованием полипротеина, который нарезается вирусными протеазами P1, HCPro и NIaPro на десять белков: P1, HCPro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa,

NIb, CP (БО) [2]. PPV заражает косточковые культуры рода *Prunus* (семейство *Rosaceae*). В природных условиях вирус передается от растения к растению различными видами тли непersistентным образом [3]. PPV отличается высоким генетическим разнообразием. На основании различий в полногеномных последовательностях и филогенетического анализа различают десять штаммов вируса: D, M, EA, C, Res, W, T, An, CR и CV. Штаммы различаются по антигенным и эпидемиологическим свойствам, кругу хозяев, географическому распространению и патогенности для различных видов и сортов косточковых культур [4].

Генофондовые коллекции косточковых культур Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (НБС) (г. Ялта, Республика Крым) насчитывают сотни сортов, гибридов и гибридных форм персика, нектарина, абрикоса, сливы и алычи. В наших предыдущих работах PPV был обнаружен на ряде деревьев местных и интроду-

дуцированных сортов этих культур. Большинство вирусных изолятов принадлежало к штамму D. Один изолят, выявленный на корневой поросли алычового подвоя, принадлежал к штамму Rec [5–8]. Критически важно определить возможные пути проникновения PPV в регион, степень его распространенности в насаждениях и уровень генетической изменчивости.

Целью данной работы являлся молекулярный анализ новых изолятов PPV в насаждениях косточковых культур НБС и на дикорастущих деревьях алычи на прилегающей территории путем секвенирования филогенетически информативных 3'-концевых последовательностей вирусного генома. Кроме того, изучено влияние природных мутаций в PPV-M- и PPV-D-специфичных эпитопах на их распознавание гомологичными моноклональными антителами.

### Материалы и методы

Листья с характерными симптомами шарки собирали в коллекционных насаждениях персика, абрикоса, сливы и с дикорастущих деревьев алычи. Лабораторную диагностику PPV осуществляли с помощью сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (double antibody sandwich ELISA; DAS-ELISA) с набором Reagent set SRA 31505 (Agdia, США) и иммуноспецифической полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с универсальными праймерами P1/P2, выявляющими любые изоляты вируса [9]. Штамм изолятов определяли методом ОТ-ПЦР с набором штаммспецифичных праймеров [10–11]. 3'-концевой участок генома, включающий ген БО и при-

мыкающие последовательности гена *Nlb* и 3'-нетранслируемого региона ((*Cter*)*Nlb*-*CP*-3'-NCR), амплифицировали, используя прямые праймеры *Nlb*F, *mM5* или *mD5* и обратный праймер 4*CP*R1 [12, 13]. Продукты ОТ-ПЦР размером 1,2–1,4 тыс. пар нуклеотидов (пн) очищали с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали в обоих направлениях в фирме Евроген. Последовательности (*Cter*)*Nlb*-*CP*-3'-NCR новых изолятов были депонированы в GenBank под номерами, указанными в табл. 1. Филогенетический анализ 3'-концевых последовательностей и определение степени их идентичности проводили с помощью программы MEGA7 [14]. Ближайших родственников новых изолятов определяли путем выравнивания 3'-концевых последовательностей на базе данных GenBank (*Plum rox potyvirus* (taxid:12211)) с помощью программы BLASTn. Влияние мутаций в PPV-M- и PPV-D-специфичных эпитопах на распознавание соответствующих изолятов моноклональными антителами AL [15] и 4DG5 [16] изучали методом непрямого сэндвич-варианта иммуноферментного анализа (triple antibody sandwich ELISA, TAS-ELISA) с помощью наборов K-11B и K-12B (Agritest srl, Италия).

### Результаты

В коллекционных насаждениях персика (*P. persica*), абрикоса (*P. armeniaca*), сливы (*P. domestica*) и на дикорастущей алыче (*P. cerasifera*) обнаружено 19 новых изолятов PPV (табл. 1). Впервые несколько изолятов вируса обнаружено в генофондовой коллекции абрикоса. Результаты диагностики PPV с помощью DAS-ELISA и ОТ-ПЦР

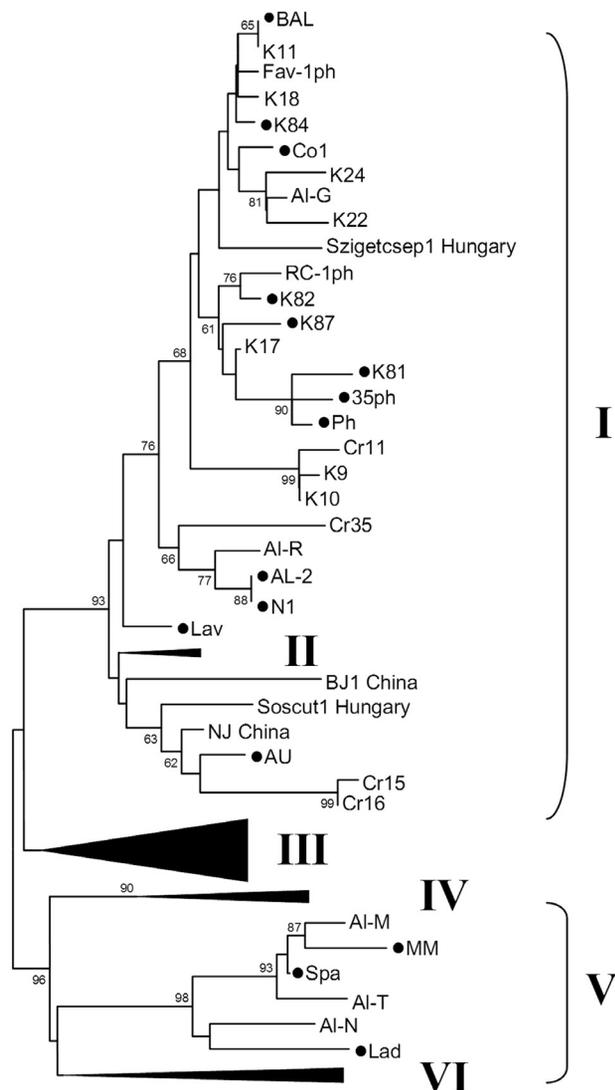
Таблица 1

Описание изолятов PPV, исследованных в данной работе

Название изолята	Растение хозяин	Тип насаждения	Сорт/Гибрид	Штамм вируса	Номер последовательности в GenBank
35ph	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Summerglo	D	MN734789
Ph	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Дружба Народов х Бэби Голд	D	MN734802
K81	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Пушистый Ранний	D	MT239476
K82	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Крымский Шедевр	D	MT239477
K84	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Ambergold	D	MT239478
K87	<i>P. persica</i>	Генофондовая коллекция	Подарок Невесте	D	MT239479
Ki	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Киото	D	MN734796
AU	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Ананасный Украинский	D	MN734792
Co1	<i>P. domestica</i>	Генофондовая коллекция	Венгерка Крупная Сладкая	D	MN734794
AL-2	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734790
BAL	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734793
Lav	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734798
N1	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734801
Spa	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734803
Lad	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734797
MM	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734799
MN	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		D	MN734800
AL-Ch	<i>P. cerasifera</i>	Дикорастущее дерево		Rec	MN734791
H23	<i>P. armeniaca</i>	Генофондовая коллекция	Херсонский 23	M	MN734795

полностью совпали. Большинство изолятов принадлежало к штамму D; выявлено также по одному изоляту штаммов Res и M. У всех изолятов ген БО длиной 990 нт кодировал белок размером 330 аминокислотных остатков. В N-конце БО обнаружен мотив DAG (Асп-Ала-Гли), опосредующий векторную передачу вируса тлями.

Выравнивание 3'-концевых последовательностей генома новых изолятов штамма D показало, что они различаются на 0,2–3,1%. При филогенетическом анализе новые изоляты распределялись в несколько кластеров или клад (рисунок).



**Рисунок.** Филогенетический анализ 3'-концевых последовательностей изолятов PPV-D. Дерево реконструировано методом максимального правдоподобия с помощью программы MEGA7. Названия и географическая локализация изолятов не российского происхождения указаны на концах ветвей. Для российских изолятов указаны только названия. Знаком (●) отмечены изоляты, изученные в данной работе. Черными треугольниками обозначены конденсированные кластеры. Кластеры I и V выделены фигурными скобками. Кластеры II и IV состоят из турецких изолятов. Кластер III объединяет изоляты PPV-D со всего мира. Значения бутстрэп-анализа из 1000 случайных выборок (>60%) указаны рядом с узлами. Масштабная черта означает количество замен на 1 нуклеотид.

Двенадцать из 17 новых изолятов оказались в кластере I. Этот кластер с высокой бутстрэп-поддержкой (93%) объединял как новые, так и охарактеризованные ранее [6, 7] изоляты PPV-D, обнаруженные в генофондовых коллекциях персика, нектарина и сливы, а также на дикорастущих деревьях алычи с территории коллекций или находящихся в непосредственной близости от них. Четкой кластеризации изолятов по виду косточковых не выявлено. Напротив, изоляты N1, AL-2 и AL-R (KX119437) с дикорастущей алычи образуют одну кладу с Cr35 (KR028386) из нектарина; изоляты K22 (KR006730) и K24 (KP198589) со сливы группируются с Al-G (KX119433) с дикорастущей алычи; 3'-концевые участки генома изолятов K11 (KP198586) с персика и BAL с дикорастущей алычи оказались идентичны. Изолят AU с абрикоса находится в одной клade с изолятами Cr15 (KP198583) и Cr16 (KP198584), обнаруженными на нектарине. Наиболее вероятной причиной отсутствия кластеризации по виду растения-хозяина является беспрепятственное распространение вируса тлями. В кластер I входят также изоляты из Китая (BJ1, NJ), Турции (конденсированная кладу II) и Венгрии (Soscut1 и Szigetcsep1). Согласно результатам BLASTn-анализа, ближайшим зарубежным родственником большинства входящих в этот кластер изолятов является Szigetcsep1 (FN179154), идентичность с которым составила 98,83–99,45%. Ближайшим родственником изолятов K9, K22, Cr11, Cr35 и Lav является турецкий изолят EdByP1326 (MK372952) (98,71–99,45% идентичности). Следует отметить, что изолят K22 был обнаружен на сливе турецкого сорта Изюм Эрик [6, 7]. Изоляты AL-R, Al-2, N1 с дикорастущей алычи, а также AU, Cr15 и Cr16 из генофондовых коллекций абрикоса и нектарина имели ближайшим родственником (99,29–99,60% идентичности) изолят NJ (MK208990) из Китая.

Клада V с бутстрэп-поддержкой 98% представлена изолятами с дикорастущей алычи на территории НБС и в его окрестностях вне коллекционных насаждений. В нее входят как изоляты, охарактеризованные в данной работе (MM, Spa, Lad), так и изоляты, описанные ранее [7]. Эта кладу является частью кластера, образованного изолятами штамма D из Турции (конденсированная кладу IV) и с Балканского полуострова (Болгария, бывшая Югославия) (конденсированная кладу VI). Входящие в кладу V крымские изоляты имели ближайшими родственниками (98,10–98,89% идентичности) турецкий изолят KtYbP1808 (MK372973) и изолят P7R1 (LT600780) из генофондовой коллекции косточковых Казахского НИИ плодоводства и виноградарства.

Изоляты MN и Ki входят в сборный кластер III, состоящий из изолятов PPV-D со всего мира, включая Россию. Установить возможные

эволюционные связи между изолятами внутри этого кластера не удалось из-за низких значений бутстрэп-анализа. Отсутствие достоверной кластеризации частичных последовательностей типично для изолятов штамма D и обусловлено высоким сходством их геномов [17].

На абрикосе сорта Херсонский 23 был обнаружен изолят Н23. При ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mM5/mM3 образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 459 пн соответственно (данные не представлены), что указывало на принадлежность Н23 к штамму М. Анализ с помощью BLASTn показал, что ближайшим родственником Н23 является изолят GR0019 из Греции (FM955843); сходство между ними на нуклеотидном уровне составило 98,3%. Различают три филогенетических группы изолятов штамма М: Ма (западноевропейские изоляты из Франции, Италии, Греции и Кипра), Mb (центрально- и восточноевропейские изоляты из Болгарии, бывшей Югославии, Венгрии, Чехии и Словакии) и Mis (турецкие изоляты, обнаруженные в окрестностях Стамбула) [18, 19]. Изолят Н23 кластеризовался с западно-европейскими изолятами. Его принадлежность к группе Ма подтвердил и анализ нуклеотидных позиций в гене БО, дискриминирующих группы Ма и Mb. В геноме Н23 позиции 8606, 8775, 8951, 9032, 9068, 9108 и 9347 заняты нуклеотидами, характерными для группы Ма. Это первое обнаружение изолята штамма М в Крыму.

На дикорастущей алыче обнаружен изолят Al-Ch. При ОТ-ПЦР с праймерами P1/PM и mD5/mM3 образовывались продукты ожидаемого размера 198 и 605 пн соответственно (данные не представлены), что указывало на принадлежность Al-Ch к штамму Rec. Анализ с помощью BLASTn показал, что ближайшим родственником Al-Ch является изолят Pd31 из Венгрии (AJ566345); сходство 3'-концевых последовательностей генома составило 99,4%. Изолят Al-Ch оказался идентичен ранее выявленным нами изолятам Kisl-1pl из Ставропольского края и K28 из Крыма [8] на 98,9 и 99,1% соответственно.

У изолята K87 в PPV-D-специфичном эпитопе <sup>55</sup>QRATKP<sup>60</sup>, локализованном в N-конце БО [6, 20], в позиции 59 остаток Лиз (К) заменен на остаток Тре (Т). Мутация K59T у изолятов PPV-D обнаружена впервые. Изолят K87 не распознавался PPV-D-специфичными моноклональными антителами 4DG5 в TAS-ELISA. Оптическая плотность в этом образце оказалась на уровне отрицательного контроля, в то время как при анализе остальных персиковых изолятов (табл. 1) с канонической последовательностью эпитопа средняя оптическая плотность составляла 2,6 ед. По-видимому, мутация K59T препятствует связыванию антител 4DG5 с гомологичным эпитопом. Следует отметить, что еще одна мутация в этой позиции – K59R – также препятствовала распознаванию изолята BOS49PI (AJ749999) антителами 4DG5 [21].

Изолят Н23 и все три российских изолята штамма Rec распознавались в TAS-ELISA с антителами AL, специфичными к штамму М. Этот результат был ожидаем, поскольку 3'-концевая последовательность PPV-Rec, включая ген БО, происходит от штамма М [22]. Предполагаемый PPV-M-специфичный эпитоп картирован внутри последовательности от 67 до 81 аминокислотного остатка N-конца БО [20]. В этой последовательности у изолятов AL-Ch, K28 и Kisl-1pl обнаружены замены (табл. 2). Методом TAS-ELISA было изучено их возможное влияние на связывание антител AL.

Остатки Про (Р) и Вал (V) в позициях 69 и 74 (оба необходимы для связывания антител AL [20]), присутствовали в БО всех четырех изолятов, что объясняет их распознавание антителами AL. Характерная для PPV-Rec замена Арг (R) на Глн (Q) в позиции 70, видимо, несущественна для связывания антител AL. Остатки Лиз (К), типичного для PPV-M в позиции 68, заменены на остатки Тре (Т) у Kisl-1pl и Al-Ch или Иле (I) у K28. Несмотря на то, что остатки К, Т и I совершенно различны, эти замены не сказывались на связывании антител AL с соответствующими изолятами. По-видимому, позиция 68 находится за пределами PPV-M-специфичного эпитопа.

Таблица 2

## Влияние аминокислотных замен в PPV-M-специфичном эпитопе на его распознавание моноклональными антителами AL

Изолят	Штамм	Последовательность эпитопа	Оптическая плотность <sup>1</sup>	
			Поликлональные антитела <sup>2</sup>	Моноклональные антитела AL <sup>3</sup>
Н23	М	<sup>67</sup> AKPRSGVYGNEDAS <sup>81</sup> *	2,07	1,71
K28	Rec	AIPQSFVYGNEDAS	2,13	1,99
Kisl-1pl	Rec	ATPQSFVYGNEDAS	2,96	2,43
Al-Ch	Rec	ATPQSFVYGNEDAS	2,15	1,74

\* Типичная для изолятов штамма М последовательность от 67 до 81 аминокислотного остатка (нумерация по белку оболочка изолята Н23 (MN734795)). Аминокислотные замены выделены жирным шрифтом.

<sup>1</sup> Средняя (из двух повторов) при длине волны 405 нм.

<sup>2</sup> DAS-ELISA, Reagent set SRA 31505 (Agdia, США).

<sup>3</sup> TAS-ELISA, K-11B kit (Agritest srl, Италия).

### Обсуждение

Обнаружение 19 новых изолятов подтверждает широкое распространение PPV в НБС и его окрестностях. Несколько изолятов найдено на дикорастущей алыче, которая, таким образом, может являться природным резерватом вируса и служить источником его дальнейшего распространения тлями, в том числе — в генофондовых коллекциях. Уникальный генофонд косточковых культур НБС широко используется в селекции и биотехнологических исследованиях. Очевидно, что выявление зараженных деревьев путем регулярных обследований насаждений является необходимой составляющей этой работы.

Большая часть изолятов принадлежала к штамму D. Превалирование PPV-D объяснимо, поскольку этот штамм — самый распространенный в мире. В каждой стране, где обнаружили PPV и проводили типирование штаммов, изоляты PPV-D составляли значительную часть популяции этого вируса [3, 4]. Генетически PPV-D является одним из самых консервативных штаммов вируса. Средний уровень дивергенции между всеми изолятами этого штамма, депонированными в GenBank, составил 1,7% для полногеномных и 1,6% — для 3'-концевых последовательностей [23]. Средний уровень дивергенции между 3'-концевыми последовательностями крымских изолятов, входящих в кластеры I, III и V (n = 35), составил 2,0%. Дивергенция между полногеномными последовательностями крымских PPV-D (n = 5) составляла 2,5% [6]. Сравнительно высокая генетическая изменчивость крымских изолятов штам-

ма D, выявленная в данной работе и предыдущих исследованиях [6, 7], указывает на давнюю интродукцию предков нынешних изолятов PPV в НБС с зараженным посадочным материалом косточковых культур.

Обнаружено также по одному изоляту штаммов M и Rec. Оба штамма широко распространены на юго-востоке зарубежной Европы. В России PPV-M находили только на сливе и персике в Ставропольском и Краснодарском краях. Все они относились к группе Mb. Зараженные растения происходили из бывшей Югославии и, очевидно, эти изоляты завезены с посадочным материалом косточковых культур при закладке новых садов на Северном Кавказе [24]. Обнаружение изолята H23 из группы Ma указывает на возможность интродукции PPV в Россию из Западной Европы. Находка Al-Ch представляет большой интерес, поскольку изоляты штамма Rec в России встречаются очень редко.

Результаты работы показывают, что, по всей вероятности, PPV проник в НБС с зараженным материалом косточковых культур в результате нескольких независимых интродукций из различных регионов мира и распространился по насаждениям тлями.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00091). Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Llacer G. Plum pox virus and estimated cost associated with Sharka disease // Bull. OEPP/EPPO Bull. 2006. Vol. 36. N 2. P. 202–204.
2. Revers F., Garcia J.A. Molecular biology of potyviruses // Adv. Virus Res. 2015. Vol. 92. P. 101–199.
3. Rimbaud L., Dallot S., Gottwald T., Decroocq V., Jacquot E., Soubeyrand S., Thebaud G. Sharka epidemiology and worldwide management strategies: learning lessons to optimize disease control in perennial plants // Annu. Rev. Phytopathol. 2015. Vol. 53. P. 17.1–17.22.
4. Garcia J.A., Glasa M., Cambra M., Candresse T. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease // Mol. Plant Pathol. 2014. Vol. 15. N 3. P. 226–241.
5. Mitrofanova I., Mitrofanova O., Chirkov S., Lesnikova-Sedoshenko N., Chelombit S. Detection and identification of Plum pox virus on Prunus species in Crimea // Agriculture and Forestry. 2015. Vol. 61. N 4. P. 197–204.
6. Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Kudryavtseva A., Prikhodko Y., Mitrofanova I. Occurrence and characterization of plum pox virus strain D isolates in European Russia and Crimea // Arch. Virol. 2016. Vol. 161. N 2. P. 425–430.
7. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanov P.A., Sheveleva A.A., Chirkov S.N. Three highly divergent groups of Plum pox virus strain D iso-
- lates coexist in stone-fruit plantings of Nikita Botanical Gardens, Crimea // Acta Hort. 2017. Vol. 1163. P. 117–122.
8. Chirkov S., Ivanov P., Sheveleva A., Kudryavtseva A., Mitrofanova I. Molecular characterization of Plum pox virus Rec isolates from Russia suggests a new insight into evolution of the strain // Virus Genes. 2018. Vol. 54. N 2. P. 328–332.
9. Wetzel T., Candresse T., Macquaire G., Ravelondro M., Dunez J. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for Plum pox virus detection // J. Virol. Meth. 1992. Vol. 39. N 1–2. P. 27–37.
10. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of Plum pox potyvirus (PPV) isolates by hemi-nested PCR and PCR-ELISA // J. Virol. Meth. 1997. Vol. 68. N 2. P. 127–137.
11. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant Plum pox virus isolates // Acta Virologica. 2004. Vol. 48. N 3. P. 173–176.
12. Wallis C.M., Stone A.L., Sherman D.J., Damsteegt V.D., Gildow F.E., Schneider W.L. Adaptation of plum pox virus to a herbaceous host (*Pisum sativum*) following serial passages // J. Gen. Virol. 2007. Vol. 88. N 10. P. 2839–2845.

13. Matic S., Elmaghrabi I., Law V., Varga A., Reed C., Myrta A., James D. Serological and molecular characterization of isolates of *Plum pox virus* strain El Amar to better understand its diversity, evolution, and unique geographic distribution // *J. Plant Pathol.* 2011. Vol. 93. N 2. P. 303–310.
14. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. Vol. 33. N 7. P. 1870–1874.
15. Boscia D., Zeramdini H., Cambra M., Potere O., Gorris M.T., Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of plum pox potyvirus // *Eur. J. Plant Pathol.* 1997. Vol. 103. N 5. P. 477–480.
16. Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Perez E., Camarasa T., Garcia J.A., Moya J.J., Lopez-Abella D., Vela C., Sanz A. Detection of plum pox potyvirus using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins // *Bull. OEPP/EPPO Bull.* 1994. Vol. 24. N 3. P. 569–577.
17. Schneider W.L., Damsteegt V.D., Gildow F.E., Stone A.L., Sherman D.J., Levy L.E., Mavrodieva V., Richwine N., Welliver R., Luster D.G. Molecular, ultrastructural, and biological characterization of Pennsylvania isolates of *Plum pox virus* // *Phytopathology.* 2011. Vol. 101. N 5. P. 627–636.
18. Dallot S., Glasa M., Jevremovic D., Kamenova I., Paunovic S., Labonne G. Mediterranean and central-eastern European countries host viruses of two different clades of *Plum pox virus* strain M // *Arch. Virol.* 2011. Vol. 156. N 3. P. 539–542.
19. Gurcan K., Teber S., Caglayan K. Further investigation of a genetically divergent group of plum pox virus-M strain in Turkey // *J. Plant Pathol.* 2019. Vol. 101. N 2. P. 385–391.
20. Candresse T., Saenz P., Garcia J. A., Boscia D., Navratil M., Gorris M.T., Cambra M. Analysis of the epitope structure of *Plum pox virus* coat protein // *Phytopathology.* 2011. Vol. 101. N 5. P. 611–619.
21. Matic S., Rwhannih M., Myrta A. Diversity of *Plum pox virus* isolates in Bosnia and Herzegovina // *Plant Pathol.* 2006. Vol. 55. N 1. P. 11–17.
22. Glasa M., Palkovics L., Kominek P., Labonne G., Pittnerova S., Kudela O., Candresse T., Subr Z. Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup // *J. Gen. Virol.* 2004. Vol. 85. N 9. P. 2671–2681.
23. Gurcan K., Teber S., Candresse T. Genetic analysis suggests a long and largely isolated evolutionary history of plum pox virus strain D in Turkey // *Plant Pathol.* 2020. Vol. 69. N 2. P. 370–378.
24. Приходько Ю.Н., Живаева Т.С., Шнейдер Ю.А. Скрининговые методы выявления комплекса штаммов вируса шарки слив (PPV) // *Садоводство и виноградарство.* 2019. № 1. С. 36–42.

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 11.05.2020 г.

Принята в печать 15.05.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# Molecular characterization of new Crimean *Plum pox virus* isolates

A.A. Sheveleva<sup>1</sup>, I.V. Mitrofanova<sup>2</sup>, V.M. Gorina<sup>2</sup>, S.N. Chirkov<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>Nikita Botanical Gardens—National Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Nikitskiy Spusk 52, Nikita, Yalta, 298648, Russia

\*e-mail: s-chirkov1@yandex.ru

Molecular analysis of new *Plum pox virus* (PPV) isolates found in peach, apricot, and plum cultivar collections of the Nikita botanical gardens—National scientific center of the Russian Academy of Sciences (NBS), as well as in wild myrobalans growing in the surrounding area was performed. Nineteen new PPV isolates were detected using ELISA and immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction. Most of them belonged to the strain D; one isolate of the strain Rec and another one belonging to the strain M were also found. 3'-terminal genomic sequences of new isolates encompassing the coat protein (CP) gene and flanking sequences of the *NIb* gene and 3'-untranslated region were sequenced. Phylogenetic analysis of the 3'-terminal sequences assigned PPV-D isolates to several clusters or clades. The average level of divergence of new and previously characterized Crimean PPV-D isolates was 2%. The comparatively high genetic diversity of the strain D isolates from the Crimea suggests a long-standing introduction of their ancestors to the NBS. The H23 isolate found in the apricot cultivar collection belonged to the strain M. This is the first PPV-M detection in the Crimea. The strain Rec Al-Ch isolate was revealed on a wild myrobalan tree. A K59T mutation was found in the CP of the K87 isolate (strain D), which impairs its recognition by PPV-D-specific monoclonal antibody 4DG5. Amino acid substitutions were found in position 68 of the CP of the Al-Ch as well as previously characterized Russian K28 and Kisl-

lpl strain Rec isolates. These substitutions did not affect the recognition of these isolates by PPV-M-specific monoclonal antibody AL suggesting that position 68 seems to be outside the epitope. In all likelihood, PPV entered the NBS as a result of several independent introductions of the infected stone fruit crops from various regions of the world and spread along the plantings by aphids.

**Keywords:** *stone fruit crops, germplasm collection, plum pox virus, phylogenetic analysis, epitope, monoclonal antibody*

#### **Сведения об авторах**

*Шевелева Анна Александровна* – науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: [anncsh@yandex.ru](mailto:anncsh@yandex.ru)

*Митрофанова Ирина Вячеславовна* – чл.-корр. РАН, докт. биол. наук, зав. отделом биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН. Тел.: 8-365-425-08-59; e-mail: [irimitrofanova@yandex.ru](mailto:irimitrofanova@yandex.ru)

*Горина Валентина Мелентьевна* – докт. с.-х. наук, вед. науч. сотр. лаборатории южных плодовых и орехоплодных культур Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН. Тел.: 8-365-425-05-16; e-mail: [valgorina@yandex.ru](mailto:valgorina@yandex.ru)

*Чирков Сергей Николаевич* – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-56-26; e-mail: [s-chirkov1@yandex.ru](mailto:s-chirkov1@yandex.ru)

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 58.006

**Коллекционный фонд лаборатории декоративных растений ГБС РАН:  
исторический аспект и современное состояние****И.А. Бондорина, А.В. Кабанов, Н.А. Мамаева, Ю.А. Хохлачева\****Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина, Россия, 127276, Москва, ул. Ботаническая, д. 4  
\*e-mail: jusic-la@yandex.ru*

Коллекционный фонд лаборатории декоративных растений Главного ботанического сада РАН существует с 1947 г. В настоящее время в его состав входит 1055 видов и разновидностей, а также 4995 сортов и садовых форм. Современная политика формирования коллекций направлена на создание уникальных собраний. В статусе крупных моноколлекций представлены родовые комплексы *Paeonia*, *Rosa*, *Syringa*, *Tulipa*. Сорты отечественной селекции доминируют в коллекциях *Dendranthema*, *Lilium*, *Phlox*, *Clematis*. На сохранение ретро-сортов ориентированы коллекции *Narcissus*, *Hemerocallis*, *Tulipa*. Основные этапы микроэволюционного развития культуры продемонстрированы на примере родов *Astilbe* и *Iris*.

**Ключевые слова:** *ГБС РАН, декоративные растения, интродукция, коллекции, методы исследований, родовые комплексы*

Коллекционный фонд лаборатории декоративных растений (ЛДР) начал формироваться в первые годы создания Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Главный ботанический сад имени Н.В. Цицина Российской академии наук» (ГБС РАН). Первые образцы декоративных растений поступили в 1946–1947 гг. из Германии. На их основе были заложены основные коллекции по отдельным родовым комплексам – *Paeonia* L., *Rosa* L., *Iris* L., *Tulipa* L. и т. д. При этом значительный вклад в формирование коллекционного фонда внесли ботанические сады СССР. Позже основным источником пополнения коллекций природными видами стали ежегодные экспедиции в различные регионы СССР и зарубежные страны – Монголию, США. Это позволило значительно расширить коллекции и провести масштабные интродукционные испытания представителей различных ботанических родов. Итогом этой работы стало создание крупных коллекций и оригинальных экспозиций [1].

Кроме пополнения за счет организации экспедиций, значительными поступлениями в коллекции ЛДР стали регулярные закупки в зарубежных питомниках. Таким образом были сформированы коллекции *Paeonia*, *Iris*, *Rosa*, *Tulipa*, *Gladiolus* L., *Hemerocallis* L. В основном интродукционное испытание проходили новые – наиболее современные – сорта, часть из которых до сих пор входит в состав коллекций лаборатории. Стоит отметить, что в настоящее время по данным культурам наблюдается очередной этап микроэволюционного развития. В результате в со-

став существующего ассортимента вошли новые сорта с оригинальными фенотипическими характеристиками [2–8], что, несомненно, является важной предпосылкой для расширения биоморфологического разнообразия коллекционных фондов ботанических садов.

В настоящее время коллекционный фонд ЛДР пополняется различными путями. Его сортовой состав расширяется в основном за счет закупок в питомниках и безвозмездной передачи растительного материала из частных коллекций. Видовой состав, как правило, пополняется с помощью делектуса. Также возобновлены экспедиционные выезды: 2006 г. – на Дальний Восток, 2008 г. – в южные районы Белгородской области, с 2010 по 2017 гг. – ежегодные экспедиции в Киргизию, 2016 г. – экспедиция на остров Сахалин и др. Продолжается обмен коллекционными фондами с ботаническими садами Санкт-Петербурга, Владивостока, Киева, Минска, Риги, Донецка, Бишкека, Алма-Аты и др.

В настоящей работе мы провели анализ количественного и качественного состава современного коллекционного фонда лаборатории декоративных растений ГБС РАН.

**Материалы и методы**

Основная часть научно-исследовательской работы выполнена на базе коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН; также использованы материалы экспедиционных исследований.

Основными донорами природных видов в коллекционном фонде ЛДР являются такие регионы, как Западная Европа, Кавказ, Сибирь,

Восточная Азия и Северная Америка. Именно эти регионы Земли наиболее перспективны для интродукции в условиях средней полосы России. Сорты и природные формы были привезены из ботанических организаций Германии (в послевоенный период), СССР, России, стран СНГ и Балтии. Частично современный сортимент был получен из российских и западноевропейских питомников.

За длительный период существования коллекционного фонда (более 70 лет) при формировании, поддержании и расширении его компонентного состава использованы классические методы интродукции:

1) эколого-географический метод [1], основой которого является привлечение в интродукционный эксперимент таксонов со сходными экологическими характеристиками и/или видов, имеющих отношение к определенной географической области.

2) метод родовых комплексов [9], суть которого состоит в формировании – в условиях конкретного пункта интродукции – максимально возможной выборки природных видов и сортов, принадлежащих к определенному ботаническому роду.

3) фитоценотический метод [10], предполагающий создание искусственных ценозов на основе реализации принципов организации и функционирования природных растительных сообществ – доноров видов для интродукционного изучения.

Также для поддержания в культуре некоторых коллекций был использован метод экотронов, основной идеей которого является частичная, но как можно более полная, имитация необходимых для нормального роста и развития растений эдафических условий. Например, для скальных растений – почвосмесь с низким содержанием питательных веществ и отсутствие избыточного увлажнения субстрата.

При формировании крупных моноколлекций применены традиционные принципы, направленные

на создание собраний, отражающих характерные особенности сортимента конкретной декоративной культуры. Это – формирование сортимента, отражающего все существующие садовые классификации культуры; создание выборки сортов, представляющих основные селекционные центры культуры и достижения наиболее известных селекционеров; формирование собрания ретро-сортов и ретро-форм; создание выборки национальных селекционных достижений; подборка культиваров, демонстрирующих микроэволюционные изменения культуры; собрание в составе коллекции уникальных и редких сортов, а также сортов-шедевров и др.

### Результаты и их обсуждение

Коллекционный фонд ЛДР ГБС РАН – уникальное по своему количеству и качеству собрание декоративных растений, перспективных для выращивания в условиях культуры в средней полосе России. По данным осенней инвентаризации 2019 г. в коллекциях ЛДР насчитывается 6050 наименований растений, в том числе 1055 видов и разновидностей, а также 4995 сортов и садовых форм, относящихся к 222 родам из 58 семейств (рис. 1).

Кроме систематического, другими базовыми принципами ранжирования состава коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН являются экологическая и географическая приуроченность растений (рис. 2 и 3).

Преобладающими экологическими группами в составе коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН являются лесные, горные и луговые виды. Наименее представлены – болотные виды, а также растения, обитающие в тундре и возле морских побережий. Это связано с тем, что прибрежные растения требуют повышенной влажности, которую сложно симитировать в условиях *ex situ* (например, в коллекции-экспозиции). Кроме того,

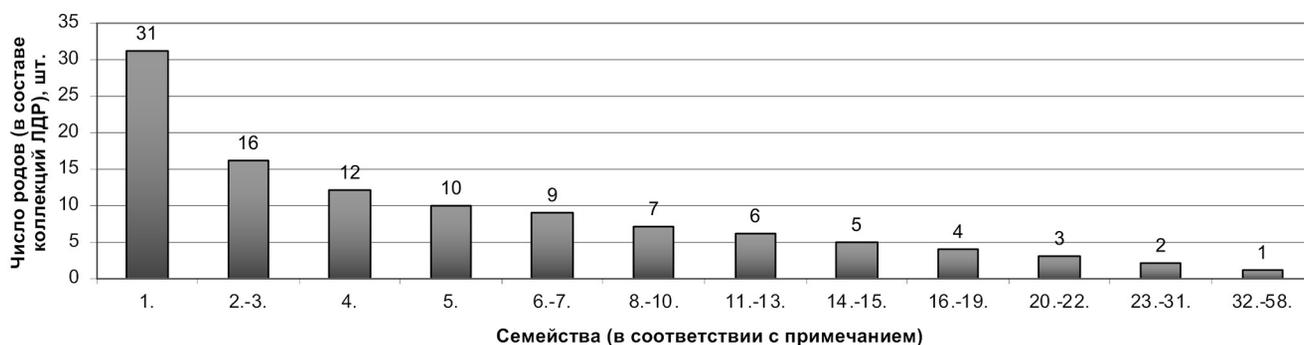


Рис. 1. Распределение родов по семействам в составе коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН

Примечание: 1 – Asteraceae; 2 – Lamiaceae; 3 – Ranunculaceae; 4 – Poaceae; 5 – Rosaceae; 6 – Brassicaceae; 7 – Saxifragaceae; 8 – Apiaceae; 9 – Campanulaceae; 10 – Convallariaceae; 11 – Boraginaceae; 12 – Caryophyllaceae; 13 – Scrophulariaceae; 14 – Berberidaceae; 15 – Liliaceae; 16 – Araceae; 17 – Aspleniaceae; 18 – Fabaceae; 19 – Papaveraceae; 20 – Amaryllidaceae; 21 – Hyacinthaceae; 22 – Plumbaginaceae; 23 – Arocynaceae; 24 – Aristolochiaceae; 25 – Crassulaceae; 26 – Fumariaceae; 27 – Iridaceae; 28 – Polemoniaceae; 29 – Polygonaceae; 30 – Primulaceae; 31 – Rubiaceae; 32 – Adiantaceae; 33 – Adoxaceae; 34 – Alliaceae; 35 – Asparagaceae; 36 – Asphodelaceae; 37 – Buxaceae; 38 – Cistaceae; 39 – Colchicaceae; 40 – Commelinaceae; 41 – Cyperaceae; 42 – Dipsacaceae; 43 – Euphorbiaceae; 44 – Gentianaceae; 45 – Geraniaceae; 46 – Hemerocallidaceae; 47 – Hydrophyllaceae; 48 – Hypericaceae; 49 – Juncaceae; 50 – Linaceae; 51 – Menispermaceae; 52 – Onagraceae; 53 – Paeoniaceae; 54 – Rutaceae; 55 – Solanaceae; 56 – Trilliaceae; 57 – Valerianaceae; 58 – Violaceae.

представители прибрежных морских сообществ в целом малочисленны. При этом многие из них не представляют интереса для интродукционных исследований или требуют особых эдафических условий. Виды, представляющие тундровые сообщества, сложно культивировать в условиях Средней России: им необходимо обеспечение особого температурно-влажностного режима.

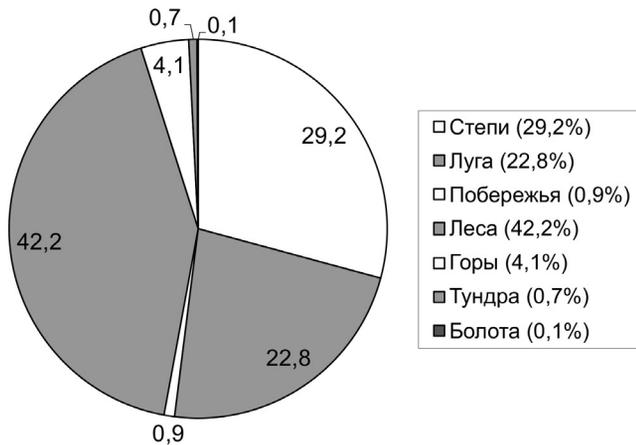


Рис. 2. Распределение видов в составе коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН в зависимости от типа растительного сообщества

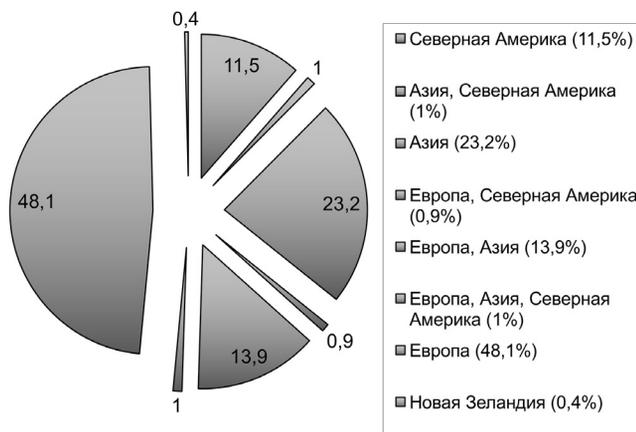


Рис. 3. Распределение видов в составе коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН в зависимости от географического происхождения

В структуре коллекционного фонда ЛДР ГБС РАН доминируют виды флоры Европы, Азии, Евразии и Северной Америки. Именно эти регионы традиционно являются наиболее перспективными донорами для интродукционной работы, так как включают в свой состав много высоко-декоративных растений [11, 12]. Однако не менее перспективным и актуальным является привлечение новых для коллекции родов и видов, представляющих флору Новой Зеландии и Австралии, а также Южной Америки. Так как условия этих регионов Земного шара существенно отличаются от климатических характеристик Средней России, выборка растений из этих регионов в настоящее время представлена только небольшим числом видов, преимущественно горных, произрастающих в умеренном климате.

Коллекции ЛДР, в соответствии с особенностями различных культур, отличаются по принципам формирования. В основу создания как отдельных коллекций, так и коллекционного фонда ЛДР в целом заложены несколько классических методов интродукции, основными из которых являются эколого-географический, фитоценотический и метод родовых комплексов [1, 9, 10].

При интродукционных исследованиях в ЛДР традиционно широко применяется эколого-фитоценотический метод [1]. На его основе создаются коллекции, включающие различные роды растений, объединенные общими экологическими требованиями. Так, более 70 лет существует коллекция-экспозиция «Теневой сад», сформированная на основе естественной дубравы. По данным инвентаризации 2019 г. она насчитывает 341 вид и 41 сорт. При этом в рамках коллекции почти полностью представлены некоторые олиготипные роды лесного происхождения (*Sanicula* L., *Vinca* L., *Asarum* L., *Brunnera* Stev., *Pulmanaria* L., *Polygonatum* Adans.).

Методической основой новой для ЛДР ГБС РАН коллекции рода *Hosta* Tratt., находящейся на этапе активного формирования, также является эколого-фитоценотический принцип. В настоящее время исследовательская работа на ее основе преимущественно направлена на создание репрезентативной выборки сортов, представляющих все современные садовые группы и основные направления селекции культуры [13, 14].

Еще одним примером успешного использования этого метода интродукции является создание коллекций-экспозиций скальных растений. На обедненном, хорошо дренированном искусственном субстрате, по данным 6-летних наблюдений, нормально развиваются представители скальных осыпей, которые ранее трудно было сохранить в коллекции при выращивании на садовых почвах.

Кроме коллекции скальных растений, следует отметить и коллекцию растений прерий Северной Америки [15–18] и степей Евразии.

Одним из наиболее широко используемых в опыте интродукции также является метод родовых комплексов [9]. Он позволяет оценить интродукционную перспективность образцов, находящихся на этапе первичного интродукционного испытания, по сравнению с перспективными и давно прошедшими интродукцию и хорошо себя зарекомендовавшими генотипами. На его основе в ЛДР созданы крупные родовые коллекции по таким культурам, как *Paeonia* (6 видов, 480 сортов), *Phlox* L. (8 видов, 185 сортов), *Tulipa* (33 вида, 316 сортов), *Lilium* L. (5 видов, 241 сорта), *Astilbe* Buch. – Nam. (8 видов, 132 сорта), *Hemerocallis* (10 видов, 201 сорт), *Syringa* (6 видов, 201 сорт), *Rosa* (26 видов, 1531 сортов), *Hosta* (8 видов, 91 сорт), *Narcissus* L. (1 вид, 345 сортов), *Dahlia* Cav. (2 вида, 151 сорт), *Dendranthema* Des Moul.

(107 сортов), *Clematis* L. (12 видов, 148 сортов), *Iris* (12 видов, 204 сорта).

Несмотря на очевидные преимущества, метод родовых комплексов имеет ряд ограничений. Он наиболее перспективен для монокультур с идентичной нормой реакции. В то же время для родовых комплексов с различными экологическими требованиями он мало применим. Так, в зависимости от почвенно-климатических условий пункта интродукции этот подход имеет целый ряд ограничений и зачастую препятствует интродукции значительного количества представителей того или иного ботанического таксона. Поэтому на современном этапе развития интродукционных исследований наиболее актуальным (в первую очередь, в аспекте сохранения биоразнообразия представителей растительного мира *ex situ*) следует считать поиск путей оптимизации метода родовых комплексов. Наиболее перспективным, на наш взгляд, является подход, связанный с имитацией необходимых эдафических условий (созданием серии экотронов).

Для поддержания возможности поливариантного использования коллекционного фонда ЛДР в исследовательской работе с коллекциями декоративных растений, как правило, учитываются различные современные тенденции. Так, необходимо отметить, что в последние годы качественный состав коллекционных фондов ботанических садов России и сопредельных стран стал в значительной мере унифицированным – в структуре коллекционных фондов большинства ботанических учреждений представлен приблизительно одинаковый родовой состав, в целом отличающийся соотношением представителей природной и культурной флоры. Поэтому в настоящее время в ЛДР ГБС РАН политика формирования, поддержания и расширения коллекций направлена на создание не только крупных, но и уникальных собраний.

Сегодня, в эпоху глобализации, классический подход, связанный с формированием в составе коллекций собраний сортов отечественной селекции представляется одним из наиболее актуальных и востребованных направлений исследовательской работы. Так, при формировании коллекций по таким родам, как *Dendranthema*, *Syringa*, *Lilium*, *Phlox*, *Paeonia*, *Clematis* основным принципом является максимальное привлечение сортов отечественной селекции. Собрания этих культур демонстрируют достижения отечественной селекции разных лет.

Перспективной коллекцией с доминированием отечественных сортов в составе коллекционного фонда ЛДР является в настоящее время собрание представителей рода *Phlox*. При этом у *Ph. paniculata* L. представлены наиболее известные культивары, сорта-шедевры, а также культивары, созданные ведущими селекционерами.

На наш взгляд, культивирование сортов отечественной селекции в составе коллекционных фондов ботанических садов должно позиционироваться как один из наиболее важных аспектов исследовательской работы (особенно на базе коллекций монокультур), поскольку является наиболее эффективным способом сохранения национальных селекционных достижений.

Совершенно иная задача ставится при формировании коллекций таких родов как *Narcissus*, *Hemerocallis*, *Tulipa*. Это исследовательская работа, направленная на сохранение ретро-сортов, которые в настоящее время в мировом сортименте активно заменяются сортами последних лет.

Относительно молодое собрание, созданное в ЛДР ГБС РАН за последние 15 лет, – коллекция представителей рода *Astilbe*. В настоящий момент в ее составе представлено 132 сорта, относящихся к 12 садовым группам (из 14 существующих в мировом ассортименте) и 8 природных видов: *A. davidii* (Franch.) Henry, *A. grandis* Stapf ex E.H. Wilson, *A. japonica* (C. Morren & Decne.) A. Gray, *A. koreana* (Kom.) Nakai, *A. microphylla* Knoll, *A. biternata* (Vent.) Britt., *A. thunbergii* (Siebold & Zucc.) Miq., *A. chinensis* (Maxim.) Franch. & Sav. Сортная часть коллекции составляет приблизительно 50% от мирового сортиamenta этой культуры (если считать, что в настоящий момент в мире сохранилось 250–270 оригинальных сортов). Таким образом, на основе собрания культиваров *Astilbe* эффективно реализован принцип сохранения в составе полевого банка максимально возможного числа сортов, составляющих мировой сортимент культуры.

Коллекция сортов *Astilbe*, вместе с собранием сортов *Iris hybrida* hort., являются показательными в аспекте реализации принципа создания выборки культиваров, представляющих основные этапы микроэволюционного развития культуры [19, 20].

Выборка культиваров *Astilbe* позволяет показать историю селекции культуры за длительный период времени (более 100 лет). В коллекцию входят культивары, представляющие страны с развитой селекцией этой культуры – Франция, Германия, Великобритания, Нидерланды, Латвия, Украина. При этом самыми старыми сортами в ее составе являются «W.E. Gladstone» (1890-е гг.) и «Washington» (1899 г.). Современная селекция представлена сортами, полученными в 2010 г. в Украине («Анюта», «Оченята») и в 2013 г. в Нидерландах («Mea», «Ploni»).

Современная коллекция представителей рода *Iris* ЛДР ГБС РАН содержит культивары *Iris hybrida* разных периодов селекции, охватывая промежуток их микроэволюционного развития, составляющий более 150 лет: от созданных в конце XIX – начале XX вв. диплоидных сортов с относительно простыми окраской и структурой околоцветника, небольшими размерами цветка

(«M-me Chereau», «Gracchus», «Quaker Lady» и др.) до тетраплоидов со значительно более крупным габитусом и сложной цветовой гаммой околоцветника («Electric», «Full Impact», «Wench», «Bewilderbeast», «Desert Echo», «Midnight Majesty», «Clarence» и др.) [21].

Востребованным аспектом исследовательской работы с сортовыми коллекциями монокультур в дальнейшем может стать расширение в их составе разнообразия культиваров из малочисленных или малораспространенных в рамках мирового ассортимента садовых групп. Так, на основе коллекции ирисов ЛДР это направление было впервые реализовано в 2000-х гг. В настоящее время продолжается формирование выборок сортов – представителей двух групп: миниатюрные карликовые Бородатые ирисы и миниатюрные высокие Бородатые ирисы [22, 23].

В долгосрочной перспективе формирования коллекционного фонда кроме подходов, основанных на классических принципах формирования сортовых коллекций, вероятно, может быть актуальным применение дополнительных подходов. Так, например, для научно-исследовательских целей может быть необходимым введение в состав коллекций сортов, оказавшихся за рамками интродукционного процесса (фенотипически сходных, хорошо изученных ранее, генетически близких и др.). Кроме того, подобный подход может быть востребованным и в работе с видовой частью коллекционного фонда.

При формировании коллекций культур с большим сортовым разнообразием, на наш взгляд, для поддержания репрезентативности выборки целесообразно использовать селекционные достижения стран с различным уровнем развития селекции, не ограничиваясь культиварами, представляющими страны-лидеры. Мировое разнообразие сортов той или иной культуры складывается как за счет доминирующих стран, крупных селекционных центров и ведущих селекционеров, так и из селекционных достижений стран с менее развитой селекцией.

Отметим, что помимо больших коллекций монокультур, в ЛДР ГБС РАН представлены и уникальные, весьма крупные по составу, сборные коллекции мало распространенных многолетников. Так, собрание низкорослых многолетних растений насчитывает 213 видов и 124 сорта, среднерослых – 142 вида и 124 сорта, высокорослых – 142 вида и 126 сортов. Все они являются основой для формирования новых родовых комплексов, которые впоследствии могут быть оформлены в виде отдельных коллекций. Так, в настоящее время уделяется особое внимание таким родам, как *Ligularia* Cass., *Geranium* L., *Filipendula* Mill., *Eupatorium* L., *Aster* L. [24–25], *Eryngium* L., *Potentilla* L., *Sedum* L., *Sanguisorba* L. Разнообразие их представителей в составе коллекционного фонда ЛДР позволяют репрезентативно представить

все экологические и географические группы и основные направления в селекции.

В настоящее время одним из новых направлений при формировании коллекционного фонда является создание коллекций, комплектование которых проходит не по географическому или родовому признаку, а на основе иных принципов. Так, в ЛДР ГБС РАН активно формируется коллекция многолетних декоративных травянистых растений позднего срока цветения. Основными задачами ее формирования являются привлечение наиболее декоративных поздноцветущих видов и сортов; оценка возможности их введения в культурную флору региона; подбор ассортимента поздноцветущих многолетних травянистых растений, перспективных для использования в городском озеленении. Это связано с тем, что в настоящий момент в городском озеленении Москвы недостаточно активно используются поздноцветущие растения. Из-за этого в осенний, а в особенности позднеосенний, период оформление города становится менее декоративным. Стоит отметить, что в настоящее время в коллекциях ЛДР представлено значительное видовое и сортовое разнообразие растений поздних сроков цветения. Это виды различного географического происхождения и экологической приуроченности. При этом достаточно много образцов перспективно для введения в массовое городское озеленение.

Основой выше указанной коллекции являются представители семейства *Asteraceae* Dum., где репрезентативно представлены виды природной флоры Северной Америки [26–28]. В настоящий момент в ее состав входит 29 природных видов и 79 сортов, полученных на основе видов североамериканской флоры. При этом проводится планомерная работа по привлечению новых для региона родов, относящихся к семейству *Asteraceae*. Так, очень перспективными для условий региона являются следующие роды, характерные для флоры Северной Америки: *Boltonia* L'Her., *Helianthus* L., *Vernonia* Schreb., *Coreopsis* L., *Solidago* L., *Eupatorium* L., *Silphium* L. [29, 30].

Однако при проведении работ с коллекцией сортов рода *Dendranthema* в ЛДР реализован иной, прямо противоположный выше изложенному, подход к отбору образцов по срокам цветения. При формировании этого собрания базовым критерием, имеющим для данной культуры в условиях средней полосы России принципиальное значение, является подбор культиваров, отличающихся наиболее ранними сроками цветения. В итоге в составе коллекционного фонда ЛДР сложился уникальный комплекс сортов, перспективных для озеленения в Средней России.

Особое значение для ЛДР традиционно имеет коллекция представителей рода *Rosa*. На протяжении достаточно длительного времени она является наиболее крупной структурной компонентой кол-

лекционного фонда лаборатории. По данным 2019 г. представители рода *Rosa* составляют 26% общего числа наименований. В коллекции представлены все садовые группы, основные страны происхождения сортов, крупные селекционные центры и ведущие селекционные фирмы. В состав коллекции также включены селекционные достижения, созданные на различных этапах: от ретро-сортов до сортов, полученных за последние несколько лет. Однако генеральной задачей современной исследовательской работы на ее основе является отбор перспективного для условий средней полосы России сортифта роз.

Длительное время древесные растения в коллекционном фонде ЛДР ГБС РАН были представлены только родами *Rosa* и *Syringa*, а также собранием привитых форм. В настоящее время тенденция исследовательской работы в ЛДР ГБС РАН по интродукционному изучению древесных растений существенно изменилась. Наиболее активно развивающейся является коллекция декоративных яблонь [31]. При этом ее основная часть сформирована относительно недавно. За последние 10 лет коллекция увеличилась до 53 сортов, форм и декоративных видов кривов. При этом четыре сорта – «Макамик», «Royalty», «Wierdak», «Selkirk» – культивируются в ЛДР уже десятки лет и показывают хорошую зимостойкость и морозоустойчивость.

Отметим, что расширение состава коллекции декоративных яблонь осуществляется ежегодно. Подавляющее большинство новых культиваров высоко-декоративно. При этом у них наблюдается ежегодное цветение и плодоношение. Однако

пока декоративные яблони редко используются в озеленении.

В современной коллекции перспективными являются сорта с махровыми цветками, такие как «Brandy Magic», «Charlotta». В то же время, в экспозиции также представлены культивары иных сортов. Например, сорта с крупными розовыми цветками и колонновидными кронами. Это выведенные селекционером М.В. Качалкиным «Розовая Сказка», «Кармелита», «Манящий Аромат», «Гранатовый Браслет», «Малиновое Ожерелье».

Таким образом, современный коллекционный фонд ЛДР ГБС РАН, являясь одним из наиболее крупных полевых генетических банков декоративных растений, перспективных для культивирования в почвенно-климатических условиях средней полосы России, сориентирован на создание и поддержание уникальных по качественному и количественному составу собраний. При этом формирование и расширение коллекций или их отдельных составляющих базируется преимущественно на классических принципах интродукции, но с учетом современных тенденций развития цветоводства и селекции декоративных растений.

Работа выполнена в рамках госзадания ГБС РАН «Биологическое разнообразие природной и культурной флоры: фундаментальные и прикладные вопросы изучения и сохранения» (№18-118021490111-5). Исследование выполнено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Трулевич Н.В. Эколого-фитоценологические основы интродукции растений. М.: Наука, 1991. 213 с.
2. McClaren B. Encyclopedia of dahlias. Portland: Timber Press, 2009. 212 pp.
3. Fiala J. L. Lilacs. A gardener's encyclopedia. Portland: Timber Press, 2008. 296 pp.
4. Toomey M. K. Leeds E. An illustrated encyclopedia of clematis. Portland: Timber Press, 2010. 428 pp.
5. Kingsbury N. Garden flora. The natural and cultural history of the plants in your garden. Portland: Timber Press, 2016. 368 pp.
6. Ruksans J. Crocuses. A complete guide to the genus. Portland: Timber Press, 2011. 280 pp.
7. Rodgers C.E., Thompson T.E., Seiler G.J. Sunflower species of the United States. Bismarck: The National Sunflower Association, 1982. 75 pp.
8. Carter S., Becker C., Lilly B. Perennials. The gardener's reference. Portland: Timber Press, 2007. 545 pp.
9. Русанов Ф.Н. Новые методы интродукции растений // Бюл. Гл. ботан. сада. 1950. № 7. С. 27–36.
10. Карпионова Р.А. Фитоценологический метод интродукции растений // VIII дендрологический конгресс социалистических стран. Тбилиси, 1982. С. 221–222.
11. Walter H. Die tropischen und subtropischen Zonen // Die Vegetation der Erde in ökologischer Betrachtung. Bd. I. Jena: Stuttgart, 1962. 538 pp.
12. Walter H. Die gemäßigten und arktischen Zonen // Die Vegetation der Erde in öko-physiologischer Betrachtung. Bd. II. Jena: Stuttgart, 1968. 1002 pp.
13. Schmid W.G. The genus Hosta. Portland: Timber Press, 2009. 428 pp.
14. Shadrack K.G., Shadrack M.S. The book of little Hostas. Portland: Timber Press, 2010. 472 pp.
15. Gleason H. A. The new Britton and Brown illustrated flora of the northeastern United States and adjacent Canada. Vol. I. Lancaster: Lancaster Press, 1968. 428 pp.
16. Gleason H. A. The new Britton and Brown illustrated flora of the northeastern United States and adjacent Canada. Vol. II. Lancaster: Lancaster Press, 1968. 655 pp.
17. Gleason H. A. The new Britton and Brown illustrated flora of the northeastern United States and adjacent Canada. Vol. III. Lancaster: Lancaster Press, 1968. 595 pp.
18. Leopold D.J. Native plants of the Northeast. A guide for gardening and conservation. Portland: Timber Press, 2005. 308 pp.

19. *Rodionenko G.I.* The evolution of the iris flower. It's structure, biology and origin // Report of the 1st International Symposium on Iris (Florence, 14-18 May, 1963). Florence, 1963. P. 357–383.
20. *Warburton B., Hamblen M.* The world of irises. Kansas: Wichita, 1995. 463 pp.
21. RHS Plant Finder 2013 / Eds. J. Cubey. London: Royal Horticultural Society, 2013. 960 pp.
22. *Rodionenko G.I.* Irises – some history, the present and the future // The Iris Year Book, 1972. P. 81–92.
23. *Mathew B.* The iris. London, 1981. 202 pp.
24. *Picton P., Picton H.* The Plant lover's guide to asters. Portland: Timber Press, 2015. 248 pp.
25. *Rogers A.* Peonies. Portland: Timber Press, 2009. 384 pp.
26. Flora of North America: Vol. 19: Magnoliophyta: Asteridae, Pt. 6: Asteraceae, Pt. 1. Oxford: Oxford Univ. Press, 2006. 610 pp.
27. Flora of North America: Vol. 20: Magnoliophyta: Asteridae, Pt. 7: Asteraceae, Pt. 2. Oxford: Oxford Univ. Press, 2006. 690 pp.
28. Flora of North America: Vol. 21: Magnoliophyta: Asteridae, Pt. 8: Asteraceae, Pt. 3. Oxford: Oxford Univ. Press, 2006. 642 pp.
29. *Bremer K.* Asteraceae. Cladistics & classification. Portland: Timber Press, 1994. 752 pp.
30. *Semple J.C.* Flora of North America. Vol. 20. Oxford: Oxford Univ. Press, 2006. 610 pp.
31. *Gelderen C.J., Gelderen D.M.* Maples for gardens (A color encyclopedia). Portland: Timber Press, 1999. 294 pp.

Поступила в редакцию 09.01.2020 г.

После доработки 13.05.2020 г.

Принята в печать 21.05.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# The collection of the laboratory of ornamental plants of MBG RAS: historical overview and current state

I.A. Bondorina, A.V. Kabanov, N.A. Mamaeva, J.A. Khokhlacheva\*

*Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Botanicheskaya, 4, Moscow, 127276, Russia*  
e-mail: [jusic-la@yandex.ru](mailto:jusic-la@yandex.ru)

The collection Fund of the laboratory of ornamental plants of the Main Botanical garden of the Russian Academy of Sciences has existed since 1947. Currently, it includes 1055 species and varieties, as well as 4995 varieties and garden forms. The current policy of forming collections is aimed at creating unique collections. The status of large mono-collections includes the generic complexes *Paeonia*, *Rosa*, *Syringa* and *Tulipa*. Varieties of domestic selection dominate in the collections of *Dendranthema*, *Lilium*, *Phlox*, *Clematis*. Collections of *Narcissus*, *Heemerocallis*, and *Tulipa* are focused on preserving retro varieties. The main stages of micro-evolutionary development of culture are demonstrated by the example of the genera *Astilbe* and *Iris*.

**Keywords:** *MBG RAS, ornamental plants, introduction, collections, research methods, generic complexes*

### Сведения об авторах

*Бондорина Ирина Анатольевна* – докт. биол. наук. зав. лабораторией декоративных растений ГБС РАН. Тел.: 8-499-977-91-45, e-mail: [bondo-irina@yandex.ru](mailto:bondo-irina@yandex.ru)

*Кабанов Александр Владимирович* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ГБС РАН. Тел.: 8-499-977-91-45, e-mail: [alex.kabanow@rambler.ru](mailto:alex.kabanow@rambler.ru)

*Мамаева Наталья Анатольевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ГБС РАН. Тел.: 8-499-977-91-45, e-mail: [mamaeva\\_n@list.ru](mailto:mamaeva_n@list.ru)

*Хохлачева Юлия Анатольевна* – канд. с/х. наук, ст. науч. сотр. ГБС РАН. Тел.: 8-499-977-91-45, e-mail: [jusic-la@yandex.ru](mailto:jusic-la@yandex.ru)

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 616.89

**Половые особенности поведения крыс с фетальным вальпроатным синдромом****И.Г. Капица\*, Е.А. Иванова, Т.А. Воронина***Лаборатория психофармакологии, Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8**\*e-mail: ingakap73@mail.ru*

На экспериментальной модели расстройств аутистического спектра, вызванных пренатальным введением вальпроата натрия в дозе 500 мг/кг, установлено, что как у самцов, так и у самок крыс линии Вистар под влиянием этого соединения развиваются отклонения поведения, характерные для людей с данным заболеванием и проявляющиеся в нарушениях социального взаимодействия, двигательной и ориентировочно-исследовательской активности, координации движений, пространственно-исследовательского поведения и гиперактивностью в ранее исследованной «знакомой» обстановке. Выраженность отмеченных нарушений поведения зависит от половой принадлежности животных, что необходимо учитывать при проведении экспериментальных исследований на модели расстройств аутистического спектра.

**Ключевые слова:** *расстройство аутистического спектра, половые различия, фетальный вальпроатный синдром, социальное взаимодействие, тревожность, крысы линии Вистар*

Расстройства аутистического спектра (РАС) – группа расстройств нейроразвития с гетерогенной этиологией, характеризующихся нарушениями в социальном взаимодействии и коммуникациях, а также ограниченными интересами и повторяющимися моделями поведения. Начиная с первых сообщений о заболевании, сделанных Лео Каннером в 1943 г. и затем Гансом Аспергером в 1944 г., отмечалось превалирование РАС у мальчиков, в соотношении 4–5:1, что имело различные последствия как для научных исследований, так и для клинической практики [1, 2]. Недавние крупномасштабные эпидемиологические исследования показали, что распространенность РАС у мальчиков и девочек может варьировать в диапазоне 2–5:1 и даже в меньших соотношениях, причем наблюдается тенденция к выявлению пропущенных ранее девочек с РАС с высоким уровнем функционирования [3]. При подозрении на РАС любого подтипа у взрослых заболевание диагностировалось у 72% мужчин и 66% женщин, причем у взрослых с высокофункциональным РАС (IQ > 70; N = 827) достоверных половых различий в выраженности симптомов социально-коммуникативной сферы не выявлено, как и в распространенности сопутствующих психопатологий при РАС разных подтипов [4].

Девочки и мальчики с РАС различаются по своим клиническим и нейробиологическим характеристикам, что обуславливает разные нарушения в поведении. У девочек типичные симптомы РАС – особенно, у тех, у которых нет умственной

неполноценности – проявляются в меньшей степени или по-другому, они лучше маскируют свои социальные трудности, могут иметь менее агрессивные и разрушительные проявления заболевания; при этом они чаще страдают от беспокойства и депрессии [4, 5]. Тем самым, РАС у девочек, особенно в более мягких формах, диагностируется сложнее. Знания половых различий проявлений РАС могут быть полезны для распознавания и терапии заболевания у обоих полов.

Экспериментальной моделью, пригодной для изучения половых различий при РАС, является модель фетального вальпроатного синдрома (ФВС) [6], индуцируемого введением солей вальпроевой кислоты (ВПК) в высоких дозах грызунам в критический период закрытия нервной трубки, что соответствует первому триместру беременности человека. Модель ФВС у грызунов признается одной из самых адекватных: у животных регистрируются изменения состояния ЦНС, сходные с человеческими, выражающиеся на морфологическом, нейромедиаторном и поведенческом уровнях [7–9]. Большинство исследований с использованием модели ФВС проводятся на самцах грызунов; только в небольшом количестве работ учитывался пол животных и связанные с ним различия в поведенческих и молекулярных изменениях в мозге [6]. Показано, что у самцов крыс с ФВС более выражены, чем у самок, социальные нарушения, повышены просудорожная готовность, особенно при использовании теста «Максимальный электрошок», и тревожность, снижена болевая чувствительность

[10–12]. У самцов мышей с ФВС в сравнении с самками выявлен более выраженный социальный дефицит, который проявлялся в снижении продолжительности обнюхивания социального объекта в тесте «Социальное взаимодействие» при сходном поведении в тестах «Открытое поле» и «Приподнятый крестообразный лабиринт» [13]. В других исследованиях у крыс обоих полов на фоне ФВС наблюдались стереотипное поведение [12], нарушение внимания и сенсомоторных реакций при минимальных различиях в специфических параметрах, характерных для РАС [14]. Клинически показано, что у пренатально подвергшихся воздействию ВПК детей РАС возникает в два раза чаще у мальчиков [8]; однако в другом исследовании обнаружена почти равная распространенность РАС, обусловленных пренатальным воздействием ВПК, у лиц обоего пола [9].

Наличие противоречивых данных требует детального изучения половых различий в проявлениях РАС, что в дальнейшем, возможно, поможет прояснить фенотипические особенности и механизмы развития данной патологии у особой разного пола.

В настоящей работе мы изучали различия в проявлениях РАС у самцов и самок крыс линии Вистар с ФВС, вызванным пренатальным введением ВПК.

### Материалы и методы

Исследование выполнено на крысах линии Вистар, родительское поколение которых было получено из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Моск. обл., Россия). Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51 и Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

ФВС вызывали пренатальным введением ВПК (Sigma-Aldrich, США) однократно внутрибрюшинно в дозе 500 мг/кг на 12,5-е сут беременности самкам крыс линии Вистар [15, 16]. Самкам крыс контрольной группы вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,2 мл на 100 г веса животного). Новорожденных крысят

(43 особи: 25 – контрольных и 18 – крысят с ФВС) отлучали от самок на 21-е сут жизни, рассаживая по половому признаку по 4–5 животных в клетку Т/3С (43,5x27,5x15,5 см). Поведенческое тестирование крыс проводили с 35-х по 43-и сут жизни, что соответствовало среднему пубертатному периоду, который характеризуется повышенной тревожностью и ростом числа социальных игровых контактов [17, 18].

Для оценки нарушений в социальной сфере на 35-е сут постнатального развития крыс проводили тест «Социальное взаимодействие» [15, 16, 19], установка для которого представляет собой плексиглазовую камеру высотой, длиной и шириной 40x72x40 см, поделенную на равные отсеки перегородками с гильотинными дверями. Тестируемое животное помещали в центральный отсек, а в крайние отсеки ставили металлические сетчатые цилиндры, в одном из которых находилось незнакомое животное («социальный объект») того же возраста и пола, что и тестируемое, а другой был пустым («несоциальный объект»). Оценивали предпочтение социального объекта несоциальному по продолжительности нахождения животного в отсеках, числу заходов в них, а также числу контактных подходов к цилиндру с социальным объектом (расстояние менее 2 см) и длительности нахождения рядом с ним за 10 мин наблюдения. По полученным данным вычисляли коэффициент предпочтения социального объекта (отношение продолжительности нахождения крысы в отсеке с социальным объектом к сумме времени, проведенного в обоих отсеках).

Ориентировочно-исследовательское поведение и тревожность у крыс с ФВС изучали на 36-е сут их постнатального развития в тесте «Открытое поле» (ОП) (TS0501-R, «НПК Открытая Наука», Россия), регистрируя на протяжении 3 мин в условиях обычной освещенности показатели горизонтальной (перемещение по периферии, прецентральной и центральной части поля) и вертикальной двигательной активности, число заглядываний в норки и актов груминга [20]. По отношению суммы показателей горизонтальной активности в центральном и прецентральном секторах поля к общей сумме показателей горизонтальной двигательной активности вычисляли индекс тревожности у крыс.

Оценку пространственной рабочей памяти у крыс с ФВС проводили на 38-е сут постнатального развития в установке «Y-лабиринт» (TS1301-R, «НПК Открытая Наука», Россия). За 24 ч до опыта вход в один из рукавов лабиринта закрывали, крысу помещали в один из рукавов («домашний») и в течение 5 мин позволяли животному свободно исследовать этот и другой («альтернативный») открытые рукава. Через 24 ч крысу сажали в центр лабиринта с 3 доступными для исследования рукавами и на протяжении 5 мин регистрировали ко-

личество посещений животным каждого из рукавов («новый», «домашний» и «альтернативный») и время пребывания в них [21].

Оценку тревожности у крыс с ФВС проводили на 40-е сут их постнатального развития в установке «Темно-светлая камера» (ТСК) (TS0702-R, НПК «Открытая Наука», Россия), моделирующей конфликт между ориентировочно-исследовательской мотивацией, направленной на ознакомление со всей камерой, и норковым рефлексом – убегающим в предпочитаемый темный отсек [20]. Время наблюдения составляло 5 мин.

Моторную активность и координацию движений крыс с ФВС оценивали на 35–39-е и 43-и сут их постнатального развития в тесте «Вращающийся стержень» на аппарате Rat Rota-Rod (Ugo Basile, Италия): барабан 6 см в диаметре, разделенный на 4 одинаковые части пятью дисками и вращающийся с нарастающим ускорением от 5 до 54 оборотов в минуту.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы «STATISTICA 10.0». Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка с последующей оценкой равенства дисперсий по критерию Левена. Так как в экспериментальных группах либо отсутствовало нормальное распределение, либо не соблюдалось межгрупповое равенство дисперсий, дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна-Уитни. Для определения статистической значимости различий повторных измерений в группе использовали парный критерий Вилкоксона. Результаты в таблицах представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего. Различия между группами считали значимыми при  $p < 0,05$ .

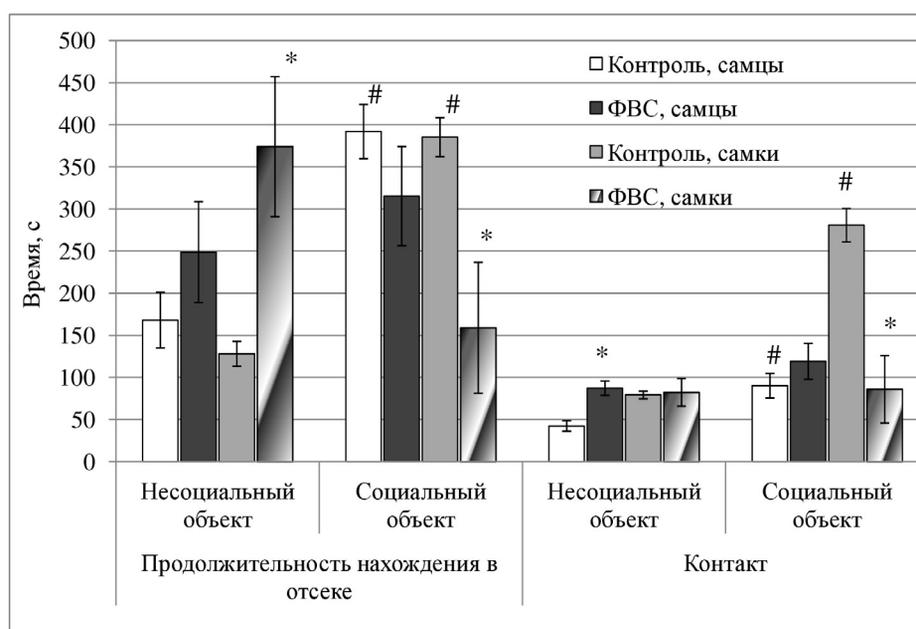
## Результаты и обсуждение

Соль ВПК, введенная в дозе 500 мг/кг самкам крыс линии Вистар, вызывала нарушение развития позвоночника у потомства, что выражалось в 100% наличии искривленного хвоста, как у самцов, так и у самок крыс.

В тесте «Социальное взаимодействие» самцы крыс контрольной группы предпочитали отсек с социальным объектом, проводя в нём в 2,3 раза ( $p < 0,05$ ) больше времени, чем в отсеке с несоциальным объектом. В то же время продолжительность нахождения самцов крыс с ФВС в разных по социальной значимости отсеках не отличалась (рис. 1). При этом на обследование социального объекта крысы-самцы с ФВС затрачивали столько же времени, что на обследование несоциального, тогда как самцы контрольной группы – в 2,13 раза ( $p < 0,05$ ) больше (рис. 1).

Поведение контрольных самок крыс линии Вистар в тесте «Социальное взаимодействие» не отличалось от поведения самцов контрольной группы. Самки контрольной группы также предпочитали социальный объект, проводя в отсеке с ним в 3,0 раза ( $p < 0,05$ ) больше времени и в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ) дольше обследуя его по сравнению с аналогичными параметрами, регистрируемыми в отсеке с несоциальным объектом.

Самки крыс с ФВС демонстрировали выраженное предпочтение несоциального объекта. Продолжительность нахождения в отсеке с социальным объектом и длительность его обследования у самок крыс с ФВС была соответственно в 2,4 ( $p < 0,05$ ) и в 3,3 раз ( $p < 0,05$ ) меньше, чем у самок крыс контрольной группы (рис. 1).



**Рис. 1.** Продолжительность нахождения самцов и самок крыс с ФВС в отсеках с объектами и контакта с ними в тесте «Социальное взаимодействие». \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола; # –  $p < 0,05$  относительно показателей для несоциального объекта (внутригрупповой показатель, парный критерий Вилкоксона)

Число заходов в отсеки со значимым и незначимым социальными объектами, а также общая двигательная активность у животных всех групп статистически не различались.

Полученные данные о явном отсутствии предпочтения социального объекта у самцов и самок крыс с ФВС в тесте «Социальное взаимодействие» свидетельствуют об утрате общительности, что характерно для РАС [15, 22, 23]. Отмеченные нарушения были более выражены у самок крыс с ФВС, что выразилось в уменьшении коэффициента предпочтения социального объекта на 60,0% ( $p < 0,05$ ) относительно соответствующего контроля (рис. 2).

Изучение ориентировочно-исследовательского и двигательного поведения, а также уровня тревожности у крыс с ФВС проводили в установке «ОП». У самцов крыс с ФВС на 36-е сут их постнатального развития выявлено статистически значимое снижение горизонтальной двигательной активности на 49,5% в центральном и на 36,0% в прецентральной секторах установки, а также на 35,9% – вертикальной активности по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (табл. 1). Индекс тревожности у самцов крыс с ФВС был в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ) ниже показателя контрольной группы, что указывает на повы-

шение тревожности у животных (табл. 1). Полученные результаты подтверждаются данными об уменьшении у крыс с ФВС двигательной активности в центральной части установки «ОП» при отсутствии выраженных изменений общего количества локомоций [16].

Отмеченное снижение двигательного и ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «ОП» у самцов крыс, подвергшихся воздействию ВПК, было еще более выраженным у самок. Так, горизонтальная активность самок крыс с экспериментальным РАС на периферии установки была статистически значимо меньше на 34,6%, число переходов в центральной и прецентральной зонах установки – на 75,0% и 68,2% соответственно, а число вертикальных стоек – на 62,6% по сравнению с соответствующими показателями самок крыс контрольной группы (табл. 1). Индекс тревожности у самок крыс с ФВС был в 2,0 раза ( $p < 0,05$ ) ниже, а число актов груминга в на 52,3% ( $p < 0,05$ ) выше по сравнению с соответствующим показателем контрольной группы (табл. 1).

Полученные результаты в условиях теста «ОП» указывают на снижение у крысят с ФВС двигательной и ориентировочно-исследовательской активности при одновременном повышении тревожности, более выраженными у самок.

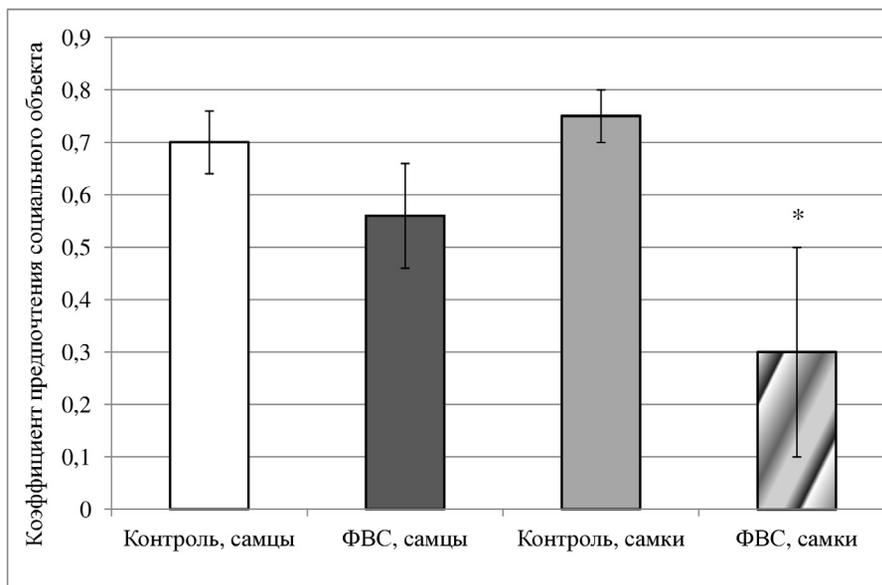


Рис. 2. Предпочтение социального объекта не социальным самцами и самками крыс с ФВС в тесте «Социальное взаимодействие». \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола

Таблица 1

Поведение самцов и самок крыс с ФВС в тесте «Открытое поле» (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Группа	Двигательная активность, ед.				Норки, ед.	Груминг, ед.	Индекс тревожности, %
	горизонтальная			вертикальная			
	периферия	2/3 поля	центр				
Контроль (самцы), n = 15	52,2 $\pm$ 4,1	11,7 $\pm$ 1,6	2,7 $\pm$ 0,6	13,1 $\pm$ 1,0	6,5 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,5	21,7 $\pm$ 2,5
ФВС (самцы), n = 10	40,8 $\pm$ 7,3	5,9 $\pm$ 2,2*	1,0 $\pm$ 0,5*	8,4 $\pm$ 1,0*	3,8 $\pm$ 1,9	3,0 $\pm$ 0,9	13,6 $\pm$ 2,9*
Контроль (самки), n = 10	65,7 $\pm$ 5,5	10,7 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,3	15,5 $\pm$ 1,5	9,5 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 0,5	16,4 $\pm$ 2,0
ФВС (самки), n = 8	43,0 $\pm$ 1,5*	3,4 $\pm$ 1,2*	0,4 $\pm$ 0,4*	5,8 $\pm$ 0,9*	5,8 $\pm$ 1,8	4,4 $\pm$ 1,0*	8,0 $\pm$ 2,6*

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола

ВПК, введенная пренатально, вызывала нарушение характерной формы поведения грызунов, в основе которой лежит исследовательская мотивация и способность выбирать для посещения ранее не исследованное пространство. Так, в тесте «У-лабиринт» крысы-самцы с ФВС оказывали выраженное предпочтение ранее обследованным «домашнему» и «альтернативному» рукавам. Доля времени, проведенного в «новом» рукаве, у крыс-самцов с ФВС была на 25,7% статистически значимо меньше показателя контрольной группы (табл. 2). Тогда как у самок крыс с ФВС доля времени, проводимая ими в «новом» рукаве, не отличалась от показателя самок крыс контрольной группы. Кроме того, у животных обоих полов с ФВС наблюдалось гиперактивное поведение, регистрируемое по увеличению общего числа переходов в 1,62 раза ( $p < 0,05$ ) у самцов и в 1,95 раза ( $p < 0,05$ ) у самок крыс по сравнению с аналогичным показателем соответствующего контроля (табл. 2).

Таким образом, у крыс с ФВС отмечались нарушение пространственного исследовательского поведения, что было более характерно для самцов, и гиперактивность, что согласуется с данными о свойственной животным с РАС стресс-индуцированной стереотипии и снижении двигательной активности в новой незнакомой ситуации и повышении локомоторной активности в знакомой, ранее исследованной обстановке [19, 24].

В тесте «ТСК» контрольные животные разных полов демонстрировали разное поведение. Так,

самки крыс линии Вистар проявляли меньшую тревожность и большую ориентировочно-исследовательскую активность по сравнению с самцами: длительность их нахождения в светлом отсеке была в 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) больше (табл. 3).

У самцов крыс с ФВС выявлены выраженные отклонения в поведении в тесте «ТСК» (табл. 3). Так, самцы крыс с ФВС в 1,7 раз ( $p < 0,05$ ) больше времени проводили в светлом отсеке и статистически значимо меньше времени пребывали в темном отсеке по сравнению с контрольной группой самцов (табл. 3). Подобное поведение наблюдалось у крыс-самцов с ФВС и в других исследованиях [19], где с 33-х до 40-х сут жизни у животных регистрировалась повышенная активность в ТСК.

Самки крыс с ФВС в тесте «ТСК» демонстрировали повышенную тревожность, что проявлялось в уменьшении в 2,8 раза ( $p < 0,05$ ) времени нахождения в светлом отсеке и значимом предпочтении темного отсека по сравнению с соответствующей контрольной группой (табл. 3).

Проведенное с 35-х по 43-и сут постнатального развития изучение моторной активности и координации движений в тесте «Вращающийся стержень» не выявило различий между контрольными группами самцов и самок крыс линии Вистар (рис. 3). Крысы обоих полов с ФВС демонстрировали статистически значимое снижение моторной активности и координации движений по сравнению с соответствующими контрольными группами, однако более выраженным это нарушение было в группе самок крыс с ФВС (рис. 3).

Таблица 2

Поведение самцов и самок крыс с ФВС в тесте «У-лабиринт» (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Группа	Самцы		Самки	
	Контроль, n = 15	ФВС, n = 10	Контроль, n = 10	ФВС, n = 8
Время нахождения в «домашнем» рукаве, с	47,0 $\pm$ 9,4	91,0 $\pm$ 10,4*	28,9 $\pm$ 8,4	90,3 $\pm$ 15,4*
Время нахождения в «альтернативном» рукаве, с	35,2 $\pm$ 5,6	81,3 $\pm$ 12,7*	33,6 $\pm$ 9,7	56,4 $\pm$ 9,7
Время нахождения в «новом» рукаве, с	55,5 $\pm$ 7,1	74,8 $\pm$ 6,5	109,1 $\pm$ 33,2	115,0 $\pm$ 27,9
Доля времени, в «новом» рукаве, %	41,3 $\pm$ 3,5	30,7 $\pm$ 3,1*	55,8 $\pm$ 9,9	42,6 $\pm$ 9,2
Число заходов в «домашний» рукав, ед.	2,9 $\pm$ 0,4	4,7 $\pm$ 0,6*	1,7 $\pm$ 0,3	4,4 $\pm$ 0,9*
Число заходов в «альтернативный» рукав, ед.	2,9 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,3*	2,0 $\pm$ 0,4	3,6 $\pm$ 0,6
Число заходов в «новый» рукав, ед.	2,5 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,4*	2,2 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5
Общее число переходов, ед.	8,2 $\pm$ 0,7	13,3 $\pm$ 1,1*	5,9 $\pm$ 0,8	11,5 $\pm$ 1,9*

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола

Таблица 3

Поведение самцов и самок крыс с ФВС в тесте «Темно-светлая камера» (среднее  $\pm$  ошибка среднего)

Группа	Самцы	Самки	Контроль, n = 10	ФВС, n = 8
	Контроль, n = 15	ФВС, n = 10		
Время нахождения в светлом отсеке, с	40,3 $\pm$ 7,2	69,7 $\pm$ 9,3*	83,8 $\pm$ 5,2#	30,5 $\pm$ 18,6*
Время нахождения в темном отсеке, с	252,8 $\pm$ 7,5	223,2 $\pm$ 9,7*	206,8 $\pm$ 9,0#	260,4 $\pm$ 17,7*
Число выглядываний, ед.	7,1 $\pm$ 0,8	7,7 $\pm$ 1,1	9,6 $\pm$ 1,6	7,8 $\pm$ 1,8
Число выходов в светлый отсек, ед.	3,6 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 0,9	4,2 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 1,5
Число заходов в темный отсек, ед.	4,7 $\pm$ 0,7	5,2 $\pm$ 1,0	4,8 $\pm$ 1,2	3,5 $\pm$ 1,4
Общее число переходов, ед.	8,3 $\pm$ 1,4	9,7 $\pm$ 1,8	9,0 $\pm$ 2,3	6,1 $\pm$ 1,5

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола;

# –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» другого пола

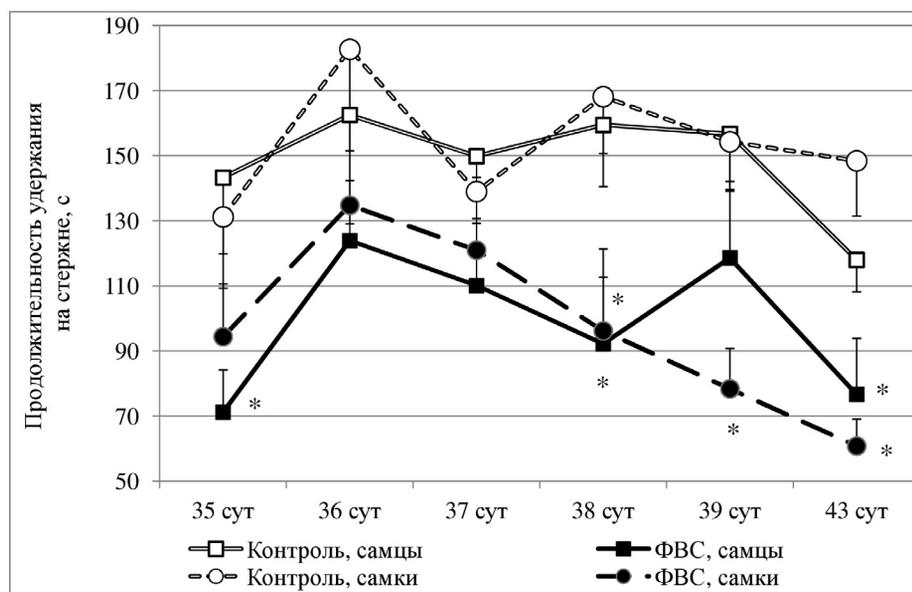


Рис. 3. Поведение самцов и самок крыс с ФВС в тесте «Вращающийся стержень».

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой «Контроль» соответствующего пола

Проведенное исследование подтвердило наличие нарушений, характерных для РАС, как у самцов, так и у самок крыс с ФВС, что выразилось в предпочтении несоциального объекта социальному в тесте «Социальное взаимодействие», нарушении пространственно-исследовательского поведения и гиперактивности животных в ранее исследованной «знакомой» обстановке «Y-лабиринта», снижении двигательной и ориентировочно-исследовательской активности при одновременном повышении тревожности в тесте «ОП» и двигательных-координационных нарушениях в тесте «Вращающийся стержень». Отмеченные нарушения были выраженными в большей степени у самок крыс с ФВС. Отличия в поведении самцов и самок крыс с ФВС наблюдались и в тесте «ТСК». Самцы крыс с ФВС демонстрировали извращение характерного для здоровых животных поведения, – избегания ярко освещенных незнакомых мест, предпочтения темной, закрытой «безопасной» зоны, – находясь длительно в светлом отсеке, тогда

как самки крыс с ФВС проявляли повышенную тревожность, предпочитая темный отсеk.

Таким образом, результаты работы свидетельствуют, что самцы и самки крыс линии Вистар в равной мере подвержены токсическому воздействию ВПК, введенной пренатально и моделирующей состояние, сходное с РАС; при этом проявления патологии могут иметь разную степень выраженности или даже противоположный характер в зависимости от половой принадлежности, что необходимо учитывать при экспериментальном исследовании данных расстройств, а также их терапии.

Работа выполнена в рамках Государственного задания по теме № 0521-2019-0007. Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными, установленными Комиссией по биоэтике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lai M.-C., Lombardo M.V., Pasco G., Ruigrok A.N.V., Wheelwright S.J., Sadek S.A., Chakrabarti B., MRC AIMS Consortium, Baron-Cohen S. A behavioral comparison of male and female adults with high functioning autism spectrum conditions // PLoS ONE. 2011. Vol. 6. N 6: e20835
- Baron-Cohen S., Lombardo M.V., Auyeung B., Ashwin E., Chakrabarti B., Knickmeyer R. Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? // PLoS Biol. 2011. Vol. 9. N 6: e1001081.
- Lai M.-C., Lombardo M.V., Auyeung B., Chakrabarti B., Baron-Cohen S. Sex/gender differences and

autism: setting the scene for future research // J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry. 2015. Vol. 54. N 1. P. 11–24.

4. Wilson C.E., Murphy C.M., McAlonan G., et al. Does sex influence the diagnostic evaluation of autism spectrum disorder in adults? // Autism. 2016. Vol. 20. N 7. P. 808–819.

5. Hiller R.M., Young R.L., Weber N.J. Sex differences in autism spectrum disorder based on DSM-5 criteria: evidence from clinician and teacher reporting // Abnorm. Child Psychol. 2014. Vol. 42. N 8. P. 1381–1393.

6. Jeon S.J., Gonzales E.L., Mabunga D.F.N., Valencia S.T., Kim D.G., Kim Y., Adil K.J.L., Shin D., Park D., Shin C.Y. Sex-specific behavioral features of rodent

models of autism spectrum disorder // *Exp. Neurobiol.* 2018. Vol. 27. N 5. P. 321–343.

7. *Mabunga D.F., Gonzales E.L., Kim J.W., Kim K.C., Shin C.Y.* Exploring the validity of valproic acid animal model of autism // *Exp. Neurobiol.* 2015. Vol. 24. N 4. P. 285–300.

8. *Christensen J., Gronborg T.K., Sorensen M.J., Schendel D., Parner E.T., Pedersen L.H., Vestergaard M.* Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism // *J. Am. Med. Assoc.* 2013. Vol. 309. N 16. P. 1696–1703.

9. *Rasalam A.D., Hailey H., Williams J.H., Moore S.J., Turnpenny P.D., Lloyd D.J., Dean J.C.* Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder // *Dev. Med. Child Neurol.* 2005. Vol. 47. N 8. P. 551–555.

10. *Kim K.C., Kim P., Go H.S., Choi C.S., Park J.H., Kim H.J., Jeon S.J., Dela Pena I.C., Han S.H., Cheong J.H., Ryu J.H., Shin C.Y.* Male-specific alteration in excitatory post-synaptic development and social interaction in prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder // *J. Neurochem.* 2013. Vol. 124. N 6. P. 832–843.

11. *Cho H., Kim C.H., Knight E.Q., Oh H.W., Park B., Kim D.G., Park H.-J.* Changes in brain metabolic connectivity underlie autistic-like social deficits in a rat model of autism spectrum disorder // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. N 1: 13213.

12. *Schneider T., Roman A., Basta-Kaim A., Kubera M., Budziszewska B., Schneider K., Przewłocki R.* Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid // *Psychoneuroendocrinology.* 2008. Vol. 33. N 6. P. 728–740.

13. *Kataoka S., Takuma K., Hara Y., Maeda Y., Ago Y., Matsuda T.* Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2013. Vol. 16. N 1. P. 91–103.

14. *Anshu K., Nair A.K., Kumaresan U.D., Kutty B.M., Srinath S., Laxmi T.R.* Altered attentional processing in male and female rats in a prenatal valproic acid exposure model of autism spectrum disorder // *Autism Res.* 2017. Vol. 10. N 12. P. 1929–1944.

15. *Bambini-Junior V., Rodrigues L., Behr G.A., Moreira J.C.F., Riesgo R., Gottfried C.* Animal model of autism induced by prenatal exposure to valproate: Behavioral changes and liver parameters // *Brain Res.* 2011. Vol. 1408. P. 8–16.

16. *Lin H.C., Gean P.W., Wang C.C., Chan Y.H., Chen P.S.* The amygdala excitatory/inhibitory balance in a valproate-induced rat autism model // *PLoS ONE.* 2013. Vol. 8. N 1: e55248.

17. *Ватаева Л.А.* Возрастные изменения в уровне тревожности у самцов и самок крыс в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Ж. эвол. биохим. физиол.* 2003. Т. 39. № 4. С. 379–383.

18. *Шушелова А.Ю.* Формирование половых различий в развитии исследовательской активности крыс пубертатного периода // *Ж. высш. нерв. деят.* 2012. Т. 62. № 1. С. 33–42.

19. *Kerr D.M., Downey L., Conboy M., Finn D.P., Roche M.* Alterations in the endocannabinoid system in the rat valproic acid model of autism // *Behav. Brain Res.* 2013. Vol. 249. P. 124–132.

20. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

21. *Vallée M., Mayo W., Dellu F., Le Moal M., Simon H., Maccari S.* Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion // *J. Neurosci.* 1997. Vol. 17. N 7. P. 2626–2636.

22. *Kaidanovich-Beilin O., Lipina T., Vukobradovic I., Roder J., Woodgett J.R.* Assessment of social interaction behaviors // *J. Vis. Exp.* 2011. N 48: e2473.

23. *Silverman J.L., Yang M., Lord C., Crawley J.N.* Behavioral phenotyping assay for mouse models of autism // *Nat. Rev. Neurosci.* 2010. Vol. 11. N 7. P. 490–502.

24. *Iwata K., Izumo N., Matsuzaki H., et al.* Vldlr overexpression causes hyperactivity in rats // *Mol. Autism.* 2012. Vol. 3. N 1: 11.

Поступила в редакцию 25.03.2020 г.

После доработки 07.05.2020 г.

Принята в печать 20.05.2020 г.

## RESEARCH ARTICLE

# Sex-specific behavioral characteristics of rats with fetal valproate syndrome

I.G. Kapitsa\*, E.A. Ivanova, T.A. Voronina

*Laboratory of Psychopharmacology, Zakusov Institute of Pharmacology,  
ul. Baltiyskaya 8, Moscow, 125315, Russia  
\*e-mail: ingakap73@mail.ru*

Both male and female Wistar rats with experimental model of autism spectrum disorders induced by prenatal administration of valproate sodium at a dose of 500 mg/kg have behavioral abnormalities similar for people with these disorders, including abnormalities of social interaction, locomotor, orientation and exploratory behaviour, coordination of movement, spatial exploration behavior and hyperactivity in previously explored “familiar” environments. The severity of behavioral abnormalities in rats with fetal valproate syndrome exhibits sex

differences, which must be taken into account when conducting experimental studies on this model.

**Keywords:** *autism spectrum disorders, sex differences, fetal valproate syndrome, social interaction, anxiety, Wistar rats*

**Сведения об авторах**

*Капица Инга Геннадиевна* – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: [ingakar73@mail.ru](mailto:ingakar73@mail.ru)

*Иванова Елена Анатольевна* – канд. фарм. наук, ст. науч. сотр. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: [iwanowaea@yandex.ru](mailto:iwanowaea@yandex.ru)

*Воронина Татьяна Александровна* – докт. мед. наук, проф., зав. лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел.: 8-495-601-24-14; e-mail: [voroninata38@gmail.com](mailto:voroninata38@gmail.com)

## ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Журнал «Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, затрагивают самые разные разделы современной биологии, но обязательно в фундаментальном аспекте. К печати принимаются только комплексные работы, представляющие собой завершённые исследования или проблемные теоретические обзоры.

«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология» входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией «Pleiades Publishing Group» на английском языке под названием «Moscow University Biological Sciences Bulletin». Оба издания синхронны и выходят четыре раза в год. Русская версия журнала индексируется в базах данных Elibrary.ru, ВИНТИ, EastView, RSCI на платформе Web of Science, а английская – в Scopus, Google Scholar, CAB International, Academic OneFile, CAB Abstracts, Gale, Global Health, Health Reference Center Academic, OCLC и Summon by Serial Solutions и др.

Желающим опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте «Pleiades Publishing». Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

### Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

### Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (\*.doc) и Word 2007 (\*.docx), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько – по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3500 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал – полуторный, отступ – 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), в сноске на первой странице указывается e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответ-

ственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (6–7 слов или словосочетаний, курсивом).

*Образец оформления «шапки» статьи:*

УДК 577.29

## **Эволюция представлений о патогенезе болезни Альцгеймера**

**Н.А. Стефанова<sup>1</sup>, Н.Г. Колосова<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup> Сектор молекулярных механизмов старения, Институт цитологии и генетики, СО РАН, Россия, 630090, г. Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, д. 10;

<sup>2</sup> кафедра цитологии и генетики, биологическое отделение, Новосибирский государственный университет, Россия, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, д. 2

\*e-mail: kolosova@mail.ru

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово «введение» не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как «результаты и обсуждение»), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова «список литературы» набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение – нижний колонтитул, середина страницы).

Информация о финансировании работы приводится перед списком литературы в следующей формулировке:

«Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 00-00-00000)».

Кроме того, также перед списком литературы авторы должны сообщить о наличии или отсутствии конфликта интересов и указать, каким этическим советом утверждены протоколы исследования, если эксперименты проводились с использованием животных или с привлечением людей в качестве испытуемых.

После списка литературы размещается фраза «Поступила в редакцию...», где позднее ответственный секретарь редколлегии укажет дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в «шапке» статьи).

*Образец оформления англоязычной «шапки» статьи:*

## **Evolution of understanding of Alzheimer's disease pathogenesis**

**N.A. Stefanova<sup>1</sup>, N.G. Kolosova<sup>1,2,\*</sup>**

<sup>1</sup>Sector of Molecular Mechanisms of Aging, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Lavrentyeva pr. 10, Novosibirsk, 630090, Russia;

<sup>2</sup>Chair of Cytology and Genetics, Department of Natural Sciences, Novosibirsk State University, Pirogova ul. 2, Novosibirsk, 630090, Russia

\*e-mail: kolosova@mail.ru

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

*Иванов Иван Иванович* — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...-...; e-mail:...

### Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи (после сведений об авторах). Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово «рисунок» («таблица») при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово «рис» и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Иллюстрации могут быть цветными, однако необходимо учитывать, что цвет будет сохранен лишь в электронной версии статьи, но не в печатной. В связи с этим необходимо подобрать цвета таким образом, чтобы при переводе рисунка в оттенки серого, его смысл не терялся и все элементы были отличимы.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

### Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные рецензируемые статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, «...что соответствует выводам Смита [19]».

*Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:*

1) **Статья в журнале.** *Авторы (инициалы после фамилии).* Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** *Авторы (инициалы после фамилии).* Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** *Авторы (инициалы после фамилии).* Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия (если редактора два, то между ними ставится и/and). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (инициалы после фамилии). Название тезисов // Название сборника тезисов (как на обложке сборника). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www..> (дата обращения: дд.мм.гггг). Дата обращения – это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www..> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП – Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry – J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва – М., New York – N.Y. и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

*Примеры оформления источников в списке литературы:*

**Статья в журнале:**

*Hayflick L.* Progress in cytoogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

*Хавинсон В.Х.* Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. exper. биол. мед. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

**Книга:**

*Holliday R.* Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 pp.

*Птушенко Е.С., Иноземцев А.А.* Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

**Статья в сборнике:**

*Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrillov V.M.* Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

*Храмченкова О.М., Бачура Ю.М.* Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

**Тезисы докладов (материалы) конференции:**

*Болеева Г.С., Борзых А.А.* Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов–2012», секция «Биология» (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

**Автореферат диссертации:**

*Борисенков М.Ф.* Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

**Электронный ресурс:**

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

#### Электронная публикация:

*Bizzarro J.J.* Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

### Особенности оформления

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м – метр, кг – килограмм, мин – минута, ° – градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия – NaCl, углекислый газ – CO<sub>2</sub> и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота – АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота – ДНК, аргинин – Арг, валин – Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов – обычным шрифтом. Например: ген – *FOXO3*, его продукт – FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ... два вида кузнечиков подсемейства мечников (Tettigoniidae, Conocerphalinae): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

### Подготовка к печати

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. Авторам необходимо предложить 2–3 потенциальных рецензентов для своей статьи (предложенные кандидаты не должны иметь с авторами совместных публикаций и не должны работать в той же организации, где работают авторы). После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через 7 дней, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позд-

нее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Далее над рукописью работает редактор, исправленный текст и его замечания отсылаются авторам на 2–3 рабочих дня.

Корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам также на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу [vestnik@mail.bio.msu.ru](mailto:vestnik@mail.bio.msu.ru). Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.